

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**Considerações microbiológicas acerca da Patologia
Periodontal Necrosante e suas implicações nas características
da lesão histológica**

Marta Liliane Margarido Taveira

MESTRADO INTEGRADO DE MEDICINA DENTÁRIA

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**Considerações microbiológicas acerca da Patologia
Periodontal Necrosante e suas implicações nas características
da lesão histológica**

Marta Liliane Margarido Taveira

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Paulo Mascarenhas

MESTRADO INTEGRADO DE MEDICINA DENTÁRIA

2013

O BOM PASTOR

O SENHOR é meu pastor: nada me falta.

Em verdes prados me faz descansar

e conduz-me às águas refrescantes.

Reconforta a minha alma

E guia-me por caminhos retos, por amor do seu nome.

Ainda que atravesse vales tenebrosos,

de nenhum mal terei medo

porque TU estás comigo

SL 23 (Ez 34; Jo 10)

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Paulo Mascarenhas, por toda a disponibilidade, dedicação e profissionalismo

À minha mãe, pelo seu apoio incondicional que me ajudou a chegar até aqui, por estar sempre ao meu lado

Ao meu pai, por depositar mais confiança em mim do que eu própria, por me ajudar a erguer ao longo do caminho

A vocês PAIS, por me fazerem querer ser sempre melhor, por serem o pilar da minha vida

À Vera, à Nana, à Beatriz, à Andreia, à Telma e à Cepêda, pela partilha de alegrias e tristezas, pelo apoio e presença, pela verdadeira amizade

À Teresa, por anos de amizade incondicional, por ser a melhor dupla de sempre, mas sobretudo, amiga até ao final dos nossos dias

A Deus, que me segurou ao colo quando caí, que me deu a mão quando tive receio, que esteve e está sempre ao meu lado. Por me ter ensinado o que é o amor e me deixar conhecê-lo

Índice

Conteúdo

Agradecimentos	iv
Índice	v
Lista de Abreviaturas	viii
Resumo	ix
Abstract.....	x
Metodologia.....	xi
I. Introdução	1
II. Perspetiva Histórica da GUN	2
III. Epidemiologia.....	3
IV. Características Clínicas.....	4
V. Fatores Predisponentes	6
➤ Stress Psicológico	6
➤ Imunossupressão.....	8
➤ Tabaco	10
VI. Outros Fatores Predisponentes	11
➤ Higiene Oral deficiente e Gingivite pré-existente	11
➤ Malnutrição.....	12
➤ História Prévia de Gingivite Ulcerativa Necrosante.....	13
VII. Características Histológicas da Lesão	13
VIII. Microbiologia	16

Espiroquetas – <i>Treponema denticola</i>	18
Fatores de Virulência:.....	19
• Produtos do metabolismo	19
• Proteína <i>Major</i> de Superfície.....	20
• Motilidade e Quimiotaxia.....	20
• Penetração epitelial.....	21
Avaliação microscópica das lesões:	23
Bactérias Fusiformes – <i>Fusobacterium nucleatum</i>	24
Fatores de virulência:.....	24
• Metabolitos Tóxicos	24
• Co agregação	24
• Resposta Inflamatória e Penetração dos tecidos.....	25
• Papel Imunossupressor	26
Avaliação microscópica das lesões:	27
Bacteróides pigmentados de negro – <i>Prevotella intermedia</i>	28
Fatores de virulência:.....	29
• Adesão e Relações interbacterianas.....	29
• Interações com o Hospedeiro	29
• Efeitos Imunossupressores e Hemolíticos	30
• Produtos do metabolismo	31
Avaliação microscópica das lesões:	31
IX. Conclusão	32

Bibliografia:.....	34
Anexos.....	40

Lista de Abreviaturas

GUN – Gengivite Ulcerativa Necrosante

PUN – Periodontite Ulcerativa Necrosante

DPN – Doenças Periodontais Necrosantes

17-HCSO – 17-Hidroxicorticosteróide

B. intermedius – *B. melaninogenicus* subsp. *intermedius*

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

PMN – Leucócitos polimorfonucleares

H₂S – Sulfeto de Hidrogénio

EORP - Espiroquetas orais relacionadas pelos seus patogénios

MMP – Metaloproteinases

BPN – Bacteróides pigmentados de negro

Resumo

A Gengivite Ulcerativa Necrosante (GUN) é uma doença periodontal inflamatória que exhibe sinais clínicos específicos e únicos, que a caracterizam como uma condição periodontal distinta. Apesar da etiologia parecer complexa e não ser completamente conhecida, a relação entre as bactérias e o padrão da lesão tem sido alvo de estudo nos últimos anos. Exames microscópicos de amostras de placa bacteriana de indivíduos com GUN, identificaram um complexo de microrganismos fusiformes e espiroquetas, associação há muito documentada por Vincent. Entretanto, estudos de microscopia eletrónica vieram revelar a presença de espiroquetas e outros microrganismos no tecido conjuntivo vital, subjacente à lesão necrótica; sendo que esta invasão, provavelmente envolve um conjunto de fatores de virulência das bactérias em causa, que de alguma forma lhes permite uma vantagem sobre as outras espécies presentes na placa bacteriana.

Embora estes microrganismos representem um papel preponderante na patogénese da GUN, atualmente o seu papel como potenciais iniciadores da lesão, ainda permanece difícil de estabelecer. É geralmente aceite que a combinação de determinados fatores predisponentes pode aumentar a suscetibilidade do periodonto à doença na presença de certos microrganismos. Estudos microbiológicos identificaram as espécies de *Treponema*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Selenomonas*, como as bactérias dominantes da lesão e estudos de cultura revelaram que os bacilos Gram negativos eram os microrganismos cultiváveis mais predominantes nas amostras de placa bacteriana de pacientes com GUN. Mais recentemente, patógenos orais relacionados com a *T. pallidum* foram associados à GUN, contudo, nenhuma relação causa-efeito foi ainda estabelecida.

Parece assim essencial que os métodos de deteção microbiológica mais recentes, se foquem numa identificação mais precisa dos agentes etiológicos da GUN, bem como na demonstração do papel real que os seus fatores de virulência desempenham na patogénese da doença e no mecanismo de ulceração gengival.

Palavras-chave: “Doença Periodontal Necrosante”; “Gengivite Ulcerativa Necrosante”; “*Treponema denticola*”; “*Fusobacterium nucleatum*”; “*Prevotella intermedia*” e “Fatores de Virulência”.

Abstract

Necrotizing Ulcerative Gingivitis (NUG) is an inflammatory periodontal disease that exhibits specific and unique clinical signs, which characterize it as a distinctive periodontal condition. Although etiology appears to be complex and not completely understood, the relationship between bacteria and the characteristic lesion has been a topic of study in last years. A fusospirochetal complex been identified in a microscopic base of plaque samples from patients with NUG, association registered a long time ago by Vincent. Meanwhile, studies using electron microscopic examination, reveled that spirochetes and other microorganisms are capable of invading the underlying connective tissues, subjacent to necrotic lesion; probably this form of invasion involves a set of virulence factors of these bacteria, which give them some advantage over the other plaque species.

Even though these organisms appear to play a major role in the pathogenesis of NUG, their etiological role in the initiation of disease has not been established yet. It is generally accepted that a combination of some predisposing factors, may increase the susceptibility of the periodontium to disease in the presence of certain microorganisms. Microbiological studies revealed *Treponema*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* and *Selenomonas* to be the dominant bacteria in the lesion and cultural studies identified Gram-negative rods as the predominant cultivable microorganisms present in the plaque samples of patients with NUG. More recently, *Treponema pallidum*-related spirochetes have been reported to be associated with NUG, however no cause-effect relationship has been established.

It seems essential that modern microbiological detection methods should be focused not only in a more accurate identification of the causative agents of NUG, but in demonstrating the likelihood that their virulence factors play a real role in the pathogenesis of NUG and in the mechanism for gingival ulceration.

Keywords: “Necrotizing Periodontal Disease”; “Necrotizing Ulcerative Gingivitis”; “*Treponema dentícola*”; “*Fusobacterium nucleatum*”; “*Prevotella intermedia*” and “Virulence Factors”.

Metodologia

Foi realizada uma revisão da literatura, na base de dados PubMed (www.pubmed.com), tendo-se utilizado as seguintes palavras-chave: “Doença Periodontal Necrosante”; “Gengivite Ulcerativa Necrosante”; “*Treponema denticola*”; “*Fusobacterium nucleatum*”; “*Prevotella intermedia*” e “Fatores de Virulência”, tendo estas sido utilizadas em separado ou em combinação.

Não foram aplicados limites temporais nem em relação aos tipos de evidência científica. A única restrição utilizada foi em artigos escritos em língua portuguesa, espanhola e inglesa.

Os artigos consultados foram obtidos a partir de revistas onde foram publicados.

I. Introdução

A Gengivite Ulcerativa Necrosante (GUN) é uma patologia única entre as doenças periodontais, que se manifesta por uma apresentação clínica aguda, com características distintas de rápida instalação de dor gengival intensa, hemorragia espontânea, ulceração necrótica do tecido gengival e destruição de uma ou mais papilas interdentárias (Rowland, 1999; Albandar e Tinoco, 2002). A Gengivite Ulcerativa Necrosante, a Periodontite Ulcerativa Necrosante (PUN) e Noma (cancro oral) são infeções orais rapidamente destrutivas e debilitantes, que têm sido consideradas como diferentes estádios clínicos da mesma doença (Horning e Cohen, 1995). Em Dezembro de 1999, o *Workshop* Internacional das Doenças Periodontais Necrosantes, classificou a GUN e a PUN, como estádios diferentes da mesma doença, fazendo ambas parte da categoria das Doenças Periodontais Necrosantes (DPN). O grupo sugeriu que a única diferença entre a GUN e a PUN é que, a primeira é uma infeção limitada à gengiva e a segunda, uma infeção que também envolve o aparelho de suporte periodontal (Anual de Periodontologia, 1999). As lesões de GUN usualmente resolvem-se em poucos dias após o tratamento, contudo, se não forem tratadas, a lesão pode envolver o aparelho de suporte periodontal e progredir para PUN (Albandar e Tinoco, 2002).

Desde 1778, em que John Hunter foi o primeiro a delinear as diferenças clínicas entre a GUN e o escorbuto (Barnes e col., 1973; Johnson e Engel, 1986; Rowland, 1999) que se fazem descrições da GUN, o que explica as múltiplas designações da doença: “Boca de Trincheira”; “Estomatite de Plaut-Vincent”; “Estomatite ulcerosa”; “Infeção de Vincent”; “Estomatite ulceromembranosa” e “Fusoespiroquetose Oral” (Johnson e Engel, 1986; Murayama e col., 1994; Rowland, 1999; Bermejo e Pérez, 2004; Gmur e col., 2004).

Embora os sinais clínicos sejam fáceis de identificar, ainda existem lacunas no que diz respeito à etiologia e patogénese da GUN (Rowland, 1999). A etiologia da GUN é complexa, não havendo um fator causal que se tenha identificado como único (Murayama e col., 1994). O desenvolvimento da GUN está intimamente associado a fatores predisponentes específicos como o stress psicológico, a imunossupressão, o tabaco, a malnutrição, uma deficiente higiene oral e uma gengivite pré-existente (Courtois e col., 1983; Rowland, 1999; Darby e Curtis, 2001). Quando o equilíbrio entre microbiota-hospedeiro é afetado, uma atividade inflamatória aguda é desencadeada com

o aparecimento de necrose tecidual (Bermejo e Pérez, 2004), sendo que o mecanismo celular e molecular da ulceração ainda não foi descrito (Murayama e col., 1994). Apesar do exato mecanismo de destruição tecidual e da patogénese da GUN permanecerem desconhecidos, estabelecer a relação entre os microrganismos mais predominantes e as características histológicas da lesão da GUN é o objetivo desta dissertação.

II. Perspetiva Histórica da GUN

O desenvolvimento da GUN está associado a um aumento do stress psicológico, fadiga ou aumento da exigência física e distúrbios nutricionais (Moulton, 1952; Loesche e col., 1982; Johnson e Engel, 1986; Rowland, 1999). Assim, não é surpreendente que as primeiras documentações históricas da GUN remontem ao serviço militar e especialmente aos tempos de guerra (Rowland, 1999). A primeira referência surge em 401 a.C. por Xenophon, que reportou que as suas tropas foram atingidas por uma praga de tecido morto e doloroso entre os dentes, durante a sua retirada da Pérsia (Barnes e col., 1973; Johnson e Engel, 1986; Murayama e col., 1994; Rowland, 1999). John Hunter, em 1778, fez a primeira distinção clínica entre as lesões gengivais, reconhecidas hoje como representativas da GUN e os sintomas orais de escorbuto. Ele notou um inchaço e edema da “gengiva entre os dentes”, juntamente com dor, hemorragia e ulceração sobre a gengiva inflamada (Barnes e col., 1973; Johnson e Engel, 1986; Rowland, 1999). Bergeron, em 1859, enquanto servia juntamente com tropas francesas, também fez referência a uma doença semelhante, referindo que esta ocorria tanto com uma forma aguda como com uma forma crónica (Barnes e col., 1973; Johnson e Engel, 1986). Em 1886, Hirsch adicionou algumas características clínicas secundárias à apresentação clínica da GUN como glândulas submaxilares aumentadas, febre e mal-estar; em relação aos sinais patognomónicos já conhecidos (Barnes e col., 1973; Johnson e Engel, 1986; Rowland, 1999). Relativamente à etiologia da doença, Plaut em 1894 e Vincent em 1896, trabalhando de forma independente, foram os primeiros a reconhecer a natureza fuso-espiroquetária da mesma. De facto, Vincent é quem está mais associado a esta forma de gengivite, formalmente e amplamente conhecida como doença de Vincent (Kardachi e Clarke, 1974; Johnson e Engel, 1986; Murayama e col., 1994; Rowland, 1999). À luz da evidência providenciada por Vincent, no início do séc. XX, os investigadores consideraram que as amostras bacteriológicas de material das

lesões orais, eram um meio auxiliar de diagnóstico (Barnes *e col.*, 1973; Johnson *e* Engel, 1986). Em 1929, Rosenthal afirmou que o exame microscópico era essencial para um diagnóstico positivo. Contudo, em 1945, o Comité de Investigação da *American Dental Association* estabeleceu que, achados positivos microbiológicos de amostras, eram de pouco valor no diagnóstico, a não ser que confirmados por achados clínicos (Johnson *e* Engel, 1986). Isto é suportado por estudos feitos por investigadores, que vieram a encontrar os microrganismos associados à GUN, na cavidade oral de pacientes periodontalmente saudáveis (Loesche *e col.*, 1982; Johnson *e* Engel, 1986; Rowland, 1999).

III. Epidemiologia

Durante a Segunda Guerra Mundial, uma incidência de 14% das doenças necrosantes atingia quer indivíduos em unidades militares quer indivíduos civis (Horning *e* Cohen, 1995; Albandar *e* Tinoco, 2002). Desde essa altura, a prevalência da GUN tem vindo a diminuir drasticamente nos países industrializados como a América do Norte, a Europa e o Japão (Horning *e* Cohen, 1995; Albandar *e* Tinoco, 2002; Bermejo *e* Pérez, 2004; Gmur *e col.*, 2004). Estudos recentes nos países desenvolvidos reportam uma prevalência entre os 0,5% e 0,19% ou ainda menos (0,001% na Dinamarca) (Horning *e* Cohen, 1995; Albandar *e* Tinoco, 2002), sendo que a baixa frequência desta patologia pode refletir-se num difícil reconhecimento clínico da mesma, mesmo por parte de profissionais de saúde (Horning *e* Cohen, 1995).

As DPN foram descritas entre populações jovens, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos (Albandar *e* Tinoco, 2002). Nos países desenvolvidos, os jovens adultos entre os 18 e os 21 anos de idade parecem mais predispostos para a doença, sendo que a média de idades mais atingida está compreendida entre os 22 e os 24 anos (Horning *e* Cohen, 1995). Este facto é suportado por muitos estudos que demonstram que a prevalência da GUN diminui com o aumento da idade (Lopez *e col.*, 2002), o que pode ser devido a muitos fatores como o hábito tabágico frequente nesta faixa etária e fatores de stress como por exemplo o recrutamento para o serviço militar (Horning *e* Cohen, 1995).

Relativamente aos países em desenvolvimento, estudos epidemiológicos feitos em populações Africanas, reportam uma maior prevalência de DPN em crianças, do que em adolescentes com mais de 10 anos de idade (Albandar *e* Tinoco, 2002). Segundo um estudo de 9 anos realizado por Jiménez *e* Baer, em 1975, em 28 crianças com GUN na Colômbia, concluiu-se que esta doença ocorria apenas em crianças de baixo nível socioeconómico e que existia uma etiologia multifatorial que incluía uma pobre higiene oral e estados de malnutrição (Jiménez *e* Baer, 1975). De facto, em muitas sociedades desfavorecidas onde existem problemas de malnutrição, acesso limitado ou inexistente a cuidados médicos sofisticados, padrões insuficientes de higiene oral, etc., a GUN permanece um problema sério de saúde (Gmur *e col.*, 2004).

IV. Características Clínicas

A GUN é uma condição periodontal distinta, que se caracteriza por uma rápida instalação de dor gengival intensa, hemorragia espontânea e ulceração necrótica do tecido gengival com destruição de uma ou mais papilas interdentárias (Courtois *e col.*, 1983; Johnson *e* Engel, 1986; Falkler *e col.*, 1987; Horning *e* Cohen, 1995; Novak, 1999; Rowland, 1999; Albandar *e* Tinoco, 2002; Bermejo *e* Pérez, 2004; Gmur *e col.*, 2004). Se qualquer um destes critérios estiver ausente, o diagnóstico de GUN não pode ser feito (Rowland, 1999). Enquanto que a maioria dos autores estão de acordo em relação à presença destes sinais predominantes, existe controvérsia relativamente a outros fatores de diagnóstico (Johnson *e* Engel, 1986; Falkler *e col.*, 1987). A presença de uma camada amarelo-esbranquiçada ou acinzentada sobre as lesões ulceradas (pseudomembrana), hálito fétido ou *foetor ex ore*, linfadenopatia, febre e mal-estar; são sinais clínicos secundários também descritos como associados à GUN (Johnson *e* Engel, 1986; Falkler *e col.*, 1987; Horning *e* Cohen, 1995; Novak, 1999; Rowland, 1999; Albandar *e* Tinoco, 2002; Bermejo *e* Pérez, 2004). Estão descritos também outros como a sialorreia, gosto metálico (Barnes *e col.*, 1973) e sensações anormais nos dentes (Murayama *e col.*, 1994).

A pseudomembrana é o tecido esbranquiçado que cobre a área necrótica. É composta por leucócitos, eritrócitos, fibrina, tecido necrótico, massas de bactérias, células epiteliais descamadas, proteínas salivares e leva à hemorragia do tecido

subjacente após a sua remoção, por exposição do tecido conjuntivo (Courtois *e col.*, 1983; Murayama *e col.*, 1994; Bermejo *e Pérez*, 2004). Apesar dos diversos estudos que suportam a presença da pseudomembrana sobre a lesão ulcerada (Tabela 1 em Anexo), Courtois *e col.* consideraram que esta característica não era um achado constante (Courtois *e col.*, 1983), facto suportado por Barnes *e col.* (1973).

Embora existam estudos na literatura que suportam o hálito fétido enquanto característica clínica frequentemente associada à GUN (Tabela 1 em Anexo), o *foetor ex ore* não está sempre presente e pode estar associado a muitas outras doenças orais como a periodontite crónica (Rowland, 1999). Também segundo Bermejo *e Pérez* (2004), o hálito fétido não é constante, variando em termos da intensidade e gravidade da patologia, o que é corroborado pelo extenso estudo de Barnes (218 casos), em que o odor fétido, apesar de frequentemente presente, não parece ser um achado consistente (Barnes *e col.*, 1973).

A linfadenopatia é um achado infrequente na GUN (Rowland, 1999) e considerada uma característica inconsistente (Courtois *e col.*, 1983; Johnson *e Engel*, 1986; Novak, 1999). Quando presente, tende a permanecer limitada aos gânglios submandibulares, apesar dos gânglios cervicais laterais e anteriores também poderem estar envolvidos (Bermejo *e Pérez*, 2004). São escassos os estudos que reportam a linfadenopatia como um achado frequente na GUN (Tabela 1 em Anexo), sendo que a sua presença está provavelmente relacionada com a severidade da doença, uma vez que é normalmente observada em casos severos e avançados (Johnson *e Engel*, 1986; Rowland, 1999; Bermejo *e Pérez*, 2004). Em relação aos sintomas de febre e mal-estar, embora existam estudos que reportam que estas são características clínicas comuns da GUN (Tabela 1 em anexo), existe alguma controvérsia, pois a maioria dos estudos clínicos defende que a sua presença pode sugerir gengivostomatite herpética primária ou mononucleose (Johnson *e Engel*, 1986; Rowland, 1999). Apesar da diversa informação que suporta a presença da linfadenopatia, da febre e do mal-estar, como sinais clínicos secundários da GUN (Rowland, 1999), de forma a auxiliar o diagnóstico em casos difíceis (Horning *e Cohen*, 1995); nenhum destes são patognomónicos da doença, uma vez que estes ocorrem frequentemente noutras formas de doença periodontal (Courtois *e col.*, 1983; Novak, 1999; Rowland, 1999).

V. Fatores Predisponentes

Desde que foi descrita pela primeira vez como uma infecção ulcerativa do tecido gengival, a GUN tem permanecido um enigma, na maioria dos seus aspetos (Falkler *e col.*, 1987). Enquanto que a etiologia e os mecanismos patogénicos permanecem pouco compreendidos, parece não existir dúvida que a GUN é causada por microrganismos colonizadores da placa supra-gengival (Falkler *e col.*, 1987; Rowland *e col.*, 1993; Bermejo *e Pérez*, 2004; Gmur *e col.*, 2004). Contudo, o desenvolvimento da GUN está também intimamente associado a fatores predisponentes secundários como o stress psicológico, a imunossupressão, o tabaco, a malnutrição e uma gengivite pré-existente (Johnson *e Engel*, 1986; Falkler *e col.*, 1987; Horning *e Cohen*, 1995; Rowland, 1999; Lopez *e col.*, 2002; Bermejo *e Pérez*, 2004; Gmur *e col.*, 2004).

➤ Stress Psicológico

O stress é um dos fatores que se acredita contribuir mais para o desenvolvimento da GUN e o stress psicológico em particular, parece estar associado ao estabelecimento da doença (Johnson *e Engel*, 1986; Murayama *e col.*, 1994). Moulton *e col.*, sugerem efeitos primários de distúrbios psicossomáticos na doença periodontal, incluindo disfunção endócrina e baixa resistência à infeção; assim como efeitos secundários de distúrbios na dieta, na higiene oral e no acentuar de hábitos parafuncionais (Moulton *e col.*, 1952). Os autores reportaram casos clínicos de indivíduos que desenvolveram GUN após demonstrarem ansiedade em lidar com diferentes situações da vida (Johnson *e Engel*, 1986).

Como referido anteriormente, está extensamente documentado que a prevalência da GUN no serviço militar, aumenta com o aumento dos níveis de stress (Maupin *e Bell*, 1975; Rowland, 1999). Segundo um estudo de Pindborg realizado em 9577 homens que serviam nas Forças Armadas Dinamarquesas; após alguns meses de serviço, a incidência da doença triplicou relativamente às avaliações iniciais (Pindborg, 1951). Este facto também é corroborado por Goldhaber *e Giddon*, noutro estudo militar, em que se reporta que a GUN ocorreu com maior incidência em grupos que acabavam de entrar no exército ou a sair do mesmo, períodos que os autores consideraram ser de alto nível de stress psicológico (Goldhaber *e Giddon in Johnson e Engel*, 1986).

Outro grupo frequentemente associado a surtos de GUN são os estudantes Universitários (Giddon *e col.*, 1964; Shannon *e col.*, 1969; Maupin *e* Bell, 1975; Rowland, 1999), como reportam Kerr *e col.* que verificaram um aumento da incidência dos casos de GUN nos estudantes em períodos de exames, em comparação com outras alturas do ano (Kerr *e col.* in Shannon *e col.*, 1969).

Durante períodos de stress psicológico, as medidas de higiene oral podem diminuir, a dieta pode tornar-se inadequada, os hábitos tabágicos podem aumentar e a resposta imune pode ser suprimida (Shannon *e col.*, 1969; Rowland, 1999). Estas alterações de hábitos, podem estar relacionadas com o processo da doença na GUN (Shannon *e col.*, 1969), porém, o stress é uma entidade que não é facilmente medida por métodos empíricos. Num animal altamente evoluído como o Homem, o stress torna-se um fator muito individualista (Maupin *e* Bell, 1975). A regulação do sistema neuro-endócrino no sistema imune, depende do hipotálamo, que secreta uma hormona, a corticotropina, para se adaptar ao stress. Esta hormona ativa as glândulas adrenais, que produzem corticosteróides, que por sua vez regulam o sistema imune; ao inibirem a secreção da IL-1, IL-6 e FNT α , a partir de células imunocompetentes (Murayama *e col.*, 1994). Atualmente, os investigadores usam o nível do 17-Hidroxycorticosteróide (17-HCSO) na urina como medida fisiológica do stress (Maupin *e* Bell, 1975; Johnson *e* Engel, 1986). Shannon *e col.* em 1969, descobriram que os pacientes com GUN, tinham um nível de 17-HCSO mais elevado na urina do que os controlos, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa. Já Maupin *e* Bell em 1975, detetaram níveis elevados estatisticamente significativos de 17-HCSO na urina dos pacientes com GUN, durante o curso da doença, em relação ao período em que esta se encontrava debelada (Johnson *e* Engel, 1986; Falkler *e col.*, 1987; Murayama *e col.*, 1994; Rowland, 1999). Esta elevação dos níveis de corticosteróides pode deprimir a resposta quimiotática e fagocítica dos neutrófilos (Johnson *e* Engel, 1986; Rowland, 1999), diminuir a resposta mitogénica dos linfócitos e alterar o rácio Linfócitos T auxiliares/ T supressores, resultando numa incapacidade de controlar as bactérias endógenas (Murayama *e col.*, 1994), facilitando assim a invasão bacteriana e o dano tecidual (Horning *e* Cohen, 1995).

Segundo um estudo de Loesche *e col.* (1982), o aumento dos níveis de corticosteróides resultantes do stress, pode deprimir a resistência e os mecanismos de

defesa do hospedeiro. Há muito que se conhecem os numerosos efeitos dos corticosteróides sobre a circulação e função dos linfócitos (Johnson *e* Engel, 1986; Rowland, 1999), assim como está reportado que as infeções agudas são mais severas durante a administração de cortisol (Johnson *e* Engel, 1986; Murayama *e col.*, 1994). No mesmo estudo, Loesche *e col.* sugerem ainda que os corticosteróides podem constituir um nutriente importante para a *B. melaninogenicus* subsp. *intermedius* (*B. intermedius*), conferindo-lhe uma vantagem nutricional seletiva sobre as outras espécies da placa, permitindo o crescimento subsequente deste patógeno (Johnson *e* Engel, 1986).

Foi sugerido ainda que o stress aumenta os níveis de epinefrina, o que pode reduzir a circulação sanguínea para a papila interdentária, numa extensão que provoque uma isquémia relativa (Kardachi *e* Clarke, 1974; Clarke *e col.*, 1981; Murayama *e col.*, 1994), tornando assim o tecido vulnerável à invasão bacteriana por anaeróbios móveis como as espiroquetas (Loesche *e col.*, 1982).

➤ **Imunossupressão**

Estudos acerca da resposta imunológica na GUN, concluíram na sua grande maioria, uma falta de funções protetoras. De facto, um dos estudos mais recentes não encontrou diferenças entre os níveis de anticorpos para a *Fusobacterium fusiforme*, *B. intermedius* e para a *Borrelia vincentii* de pacientes com GUN, quando comparados com os controlos (Rowland, 1999). Rowland *e col.* (1993) reportaram uma resposta diminuída dos níveis de IgG e IgM em pacientes com GUN, quando comparados com os controlos, para 4 isolados de *P. intermedia*. Além disso, não se verificaram diferenças nos níveis de IgG e de IgM para os isolados de espiroquetas de pacientes com GUN quando comparados com os controlos (Rowland, 1999). Esta falta de resposta imune humoral nos pacientes com GUN é surpreendente, tanto pela perspectiva de uma carga bacteriana elevada, como pela invasão das bactérias dos tecidos gengivais ulcerados, característico destes pacientes (Chung *e col.* 1983). Em contraste com os estudos referidos anteriormente, um estudo de Chung *e col.* detetou níveis significativamente elevados de IgG para espiroquetas de tamanho intermédio e para os *B. intermedius* em pacientes com GUN (Johnson *e* Engel, 1986). Embora existam na literatura resultados contraditórios no que diz respeito aos níveis de anticorpos no soro de pacientes com GUN, a frequência com que esta doença ocorre em estádios de

doenças que envolvem uma redução do número e/ou funções dos leucócitos; levou à suposição de que a depressão dos mecanismos de defesa do hospedeiro pode desempenhar um papel significativo na etiologia e severidade da GUN (Cogen *e col.*, 1983; Murayama *e col.*, 1994). É evidente que, independentemente dos mecanismos que estão envolvidos, uma depressão imunitária generalizada (função dos polimorfonucleares, resposta de anticorpos e mitogénese linfocitária) está associada ao aparecimento e estabelecimento da GUN (Rowland, 1999), suportando a maior incidência desta patologia nestes pacientes (Murayama *e col.*, 1994). Assim, não é surpreendente que a patologia tenha sido associada a pacientes com doenças neoplásicas, Lúpus Eritematoso Sistémico, Doença de Von Willebrand, Agranulocitose induzida por consumo de drogas (Murayama *e col.*, 1994), à infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Johnson *e Engel*, 1986; Murayama *e col.*, 1994; Horning *e Cohen*, 1995; Novak, 1999; Rowland, 1999; Bermejo *e Pérez*, 2004). Num estudo de Horning *e Cohen* (1995), a análise dos fatores predisponentes revelou que a seropositividade para o VIH, ultrapassava todos os outros fatores em importância, quando presente. Apesar de outras formas de gengivite e periodontite serem encontradas em indivíduos infetados com o VIH, um dos primeiros sinais de infeção com o VIH pode ser a gengivite dolorosa associada com a GUN (Murayama *e col.*, 1994; Rowland, 1999). No geral, indivíduos com SIDA que sofram de GUN, têm os sinais clássicos de ulceração e necrose da gengiva interproximal, hemorragia, dor e halitose. No entanto, nestes indivíduos, a lesão pode progredir rapidamente para PUN com perda das estruturas de suporte, ulceração e necrose dos tecidos moles e perda óssea severa com ocasional perda dos dentes (Murayama *e col.*, 1994; Bermejo *e Pérez*, 2004). Um estudo recente que demonstra o papel da resposta do hospedeiro no estabelecimento da GUN, é o de Lopez *e col.*, que relatam uma associação significativamente positiva entre a diabetes e a patologia (Bermejo *e Pérez*, 2004). Embora a diabetes tenha sido frequentemente associada à periodontite crónica, esta ainda não tinha sido considerada um fator etiológico da GUN. Pensa-se que os mecanismos que explicam a associação entre a diabetes e a periodontite crónica passem por uma disfunção dos neutrófilos, microangiopatia, distúrbios no metabolismo do colagénio e deficiências na cicatrização. Se estes mesmos mecanismos operarem na GUN, é plausível considerar o papel significativo da resposta do hospedeiro para a ocorrência da patologia (Lopez *e col.*, 2002).

➤ **Tabaco**

O tabaco é considerado um dos fatores de risco mais significativos para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal (Sayers *e col.*, 1999). Vários autores relatam que o consumo excessivo do tabaco pode ser um fator predisponente para a GUN (Johnson *e Engel*, 1986), pois tanto a plausibilidade do ponto de vista bioquímico como estudos epidemiológicos suportam essa hipótese (Murayama *e col.*, 1994). Segundo um estudo de Giddon *e col.* (1964), a percentagem de indivíduos fumadores no grupo com GUN era de 63%, o que revelou ser mais baixo do que o reportado por Pindborg para os grupos com GUN nas populações militares (98%). Também um estudo de Stevens *e col.* em 1984, comparando os seus pacientes com GUN e o grupo de controlo, denotou uma elevada incidência de consumo de tabaco entre os pacientes com a doença (94%), relativamente com os indivíduos saudáveis do controlo (Stevens *e col. in Falkler e col.*, 1987).

A nicotina, um componente importante do cigarro, já foi testada e confirmada como uma substância capaz de potenciar o efeito patológico de toxinas de alguns periodontopatogénios (Sayers *e col.*, 1997). A cotinina, substância na qual a nicotina é metabolizada, também foi testada e reportada como capaz de aumentar o potencial periodontopatogénico de produtos bacterianos da *P. nigrescens* e da *P. intermedia* (Sayers *e col.*, 1999).

Além destes efeitos dos componentes do cigarro, foi reportado que o tabaco tem um mecanismo semelhante ao do stress (Kardachi *e Clarke*, 1974; Clarke *e col.*, 1981; Horning *e Cohen*, 1995). Kardachi *e Clarke*, em 1974, reportaram uma libertação local e sistémica de catecolaminas em resposta à nicotina, e sugeriram que os efeitos das catecolaminas, podiam causar uma redução na circulação sanguínea da papila gengival, o que por sua vez contribuiria para a necrose da papila (Johnson *e Engel*, 1986, Murayama *e col.*, 1994). Esta hipótese é mais tarde suportada por Clarke *e col.* em 1981, que demonstraram que a infusão intra-arterial de epinefrina ou nicotina em ratos, resultava numa diminuição potente do fluxo sanguíneo gengival (Johnson *e Engel*, 1986). Os autores relatam que os vasos sanguíneos gengivais são arteríolas terminais e que no topo da papila, não há circulação colateral, resultando numa vulnerabilidade dos tecidos. Este facto torna-se desfavorável, na medida em que o epitélio da papila está totalmente dependente da difusão do tecido conjuntivo subjacente, para obter os

nutrientes e oxigénio que necessita. Uma severa redução da circulação sanguínea gengival induzida pelo stress ou pela nicotina, poderia ser responsável pela perda de vitalidade das regiões mais vulneráveis do epitélio gengival (Kardachi *e* Clarke, 1974; Clarke *e col.*, 1981).

Apesar da relação entre o tabaco e a incidência da GUN ter sido vastamente reconhecida num número considerável de estudos, esta associação pode representar uma correlação casual (Murayama *e col.*, 1994). Segundo um estudo mais recente de Lopez *e col.*, o tabaco não foi considerado um fator predisponente importante, nem quando foi considerada a duração do hábito tabágico, nem relativamente à quantidade de cigarros fumados por dia (Lopez *e col.*, 2002). A relação causal entre o tabaco e a etiologia da GUN ainda não foi totalmente esclarecida, alguns autores assumem que este fator é responsável por diminuir a resistência local da gengiva, facilitando a invasão do tecido gengival marginal por microrganismos fuso-espiroquetários (Kardachi *e* Clarke, 1974); enquanto que outros acreditam que este hábito representa um traço característico de certos tipos de personalidade ou de estados emocionais que podem predispor o indivíduo para a Gengivite Ulcerativa Necrosante (Falkler *e col.*, 1987).

VI. Outros Fatores Predisponentes

➤ Higiene Oral deficiente e Gengivite pré-existente

Muitos estudos têm relatado uma associação positiva entre uma higiene oral deficiente e a GUN (Giddon *e col.*, 1964; Jiménez *e* Baer, 1975; Johnson *e* Engel, 1986; Horning *e* Cohen, 1995; Lopez *e col.*, 2002; Bermejo *e* Pérez, 2004). Segundo um estudo de 9 anos em crianças com GUN, realizado por Jiménez *e* Baer em 1975, os baixos padrões de higiene oral foram fatores significativos na etiologia da doença (Johnson *e* Engel, 1986) dado que 100% da amostra tinha uma higiene oral precária (Jiménez *e* Baer, 1975). Um estudo Nigeriano em 1993, reportou que 2,4% das crianças com boa higiene oral tinha GUN, comparado com 62,8% com má higiene oral e 66,7% com muito má higiene oral (Horning *e* Cohen, 1995). Isto é corroborado por um estudo de 218 casos de GUN, que suporta a relação entre baixos padrões de higiene oral e um aumento da incidência da doença (Barnes *e col.*, 1973). Porém, a presença de doença não é sempre um resultado de falta de medidas de higiene oral por parte do paciente

(Johnson e Engel, 1986), sendo que é difícil aferir entre os estudos, se a acumulação de placa é a causa ou consequência da patologia necrosante (Lopez e col., 2002). Segundo um estudo de Pindborg, 90% dos casos de GUN começam a partir de uma simples gengivite marginal (Pindborg in Johnson e Engel, 1986). Contrariamente a este estudo, Giddon e col. reportam que uma gengivite pré-existente não parecer ser essencial para a ocorrência da doença (Giddon e col., 1964).

No modelo proposto por Clarke e col. (1981), a GUN é uma condição isquémica necrótica de um epitélio gengival cronicamente inflamado, em que os organismos se tornam dominantes em virtude da sua capacidade para sobreviver preferencialmente num ambiente necrótico. Segundo os autores, a necrose epitelial só pode ocorrer quando uma isquémia gengival se combina com uma gengivite marginal crónica. Também Hooper e Seymour, em 1979, detetaram a presença de células plasmáticas e linfócitos em estágios agudos da doença, o que sugeriram ser uma reflexão de uma GUN sobreposta a uma gengivite crónica marginal já estabelecida (Hooper e Seymour, 1979), uma vez que as células plasmáticas e linfocitárias são o tipo celular predominante na gengivite crónica, mas não são esperadas numa lesão aguda (Johnson e Engel, 1986).

➤ **Malnutrição**

Como referido anteriormente, a malnutrição tem sido reportada como um fator predisponente para o desenvolvimento da GUN (Jiménez e Baer, 1975; Murayama e col., 1994; Horning e Cohen, 1995; Novak, 1999; Rowland, 1999). O aparecimento da GUN em crianças, parece estar relacionado com a malnutrição, particularmente numa deficiência vitamínica de ácido ascórbico (Murayama e col., 1994), num défice de ingestão de proteínas e secundária a infeções virais como o sarampo (Rowland, 1999). Isto é suportado por um estudo de Jiménez e Baer (1975), que examinaram crianças com GUN na Colômbia durante 9 anos e cujos exames médicos revelaram que todas elas sofriam de uma deficiência nutricional, sobretudo ao nível das proteínas e do grupo da Vitamina B.

A GUN que ocorre em crianças malnutridas, pode progredir para uma infeção fulminante e desfigurante, por vezes letal, conhecida por noma ou cancro oral; sobretudo em pacientes imunodeprimidos (Novak, 1999; Rowland, 1999; Bermejo e Pérez, 2004). Segundo um estudo recente, o noma está associado a níveis aumentados de cortisol, a níveis reduzidos de zinco e de aminoácidos em crianças previamente

infetadas por sarampo, ou pelo vírus do herpes simplex, em conjunto com uma infeção pela bactéria *F. necrophorum* (Rowland, 1999). Isto é consistente com um estudo de Enwonwu, que relata que todos os seus casos de noma ocorreram em crianças malnutridas, de baixos grupos socioeconómicos e que revelaram história de doença debilitante antes do aparecimento dos sintomas orais, mais frequentemente uma infeção viral, como o sarampo ou varicela (Jiménez e Baer, 1975). Foi sugerido que crianças com uma deficiência proteica severa, podem apresentar padrões de destruição elevados, pois a deficiência proteica é geralmente concomitante com uma deficiência de Ferro. Essa deficiência férrica pode modificar a capacidade dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) circulantes de neutralizarem as bactérias, por uma afeção da enzima dependente do Ferro, mieloperoxidase, que é essencial à destruição intracelular das bactérias (Jiménez e Baer, 1975).

➤ **História Prévia de Gengivite Ulcerativa Necrosante**

As crateras que podem resultar das lesões necróticas na papila, são sequelas que refletem as crises inflamatórias sofridas no passado. A acumulação de placa bacteriana nestas crateras, é responsável pela reativação da inflamação e pelo estabelecimento de um novo episódio de GUN (Bermejo e Pérez, 2004). Num estudo de Horning e Cohen, onde 68 pacientes com GUN foram observados e tratados ao longo de 5 anos, o segundo fator predisponente mais importante, depois da seropositividade para o VIH, foi a história prévia de GUN. 28% dos pacientes reportaram uma infeção gengival dolorosa prévia e 21% tinha cicatrizes gengivais sugestivas de uma GUN passada. Este facto parece ser plausível, já que a maioria dos fatores predisponentes tende a refletir estilos de vida individuais (Horning e Cohen, 1995).

VII. Características Histológicas da Lesão

A lesão histológica fundamental da GUN é uma úlcera do epitélio estratificado escamoso (Bermejo e Pérez, 2004), com tecido necrótico e micro-ulcerações evidentes no topo da papila gengival e ocasionalmente, dentro do epitélio juncional (Courtois e col., 1983). A lâmina própria é caracterizada por um denso infiltrado inflamatório composto por PMN (Courtois e col., 1983; Bermejo e Pérez, 2004), linfócitos e células plasmáticas. Os vasos sanguíneos, sobretudo subjacentes ao epitélio juncional,

apresentam-se dilatados e aumentados pela presença de eritrócitos (Courtois *e col.*, 1983). Num estudo clássico de microscopia eletrónica em 1965, quatro zonas associadas com a lesão gengival da GUN foram identificadas (Johnson *e* Engel, 1986; Rowland, 1999; Bermejo *e* Pérez, 2004):

1. Zona Bacteriana: Composta por uma grande massa de bactérias com diferentes morfotipos, incluindo algumas espiroquetas (Rowland, 1999) de tamanho pequeno, intermédio ou grande (Listgarten, 1965; Johnson *e* Engel, 1986) e outros tipos de bactérias como cocos, fusiformes, bacilos curvos, bacilos pequenos e organismos filamentosos, sendo que as espiroquetas constituem uma minoria dos tipos morfológicos observados. Esta camada contém ainda restos celulares e material do tipo fibrina (Courtois *e col.*, 1983).
2. Zona rica em Neutrófilos: Adjacente à zona bacteriana, esta camada contém leucócitos, com uma predominância dos PMN (Johnson *e* Engel, 1986; Rowland, 1999; Bermejo *e* Pérez, 2004) que conseguem ser reconhecidos pelos seus grânulos citoplasmáticos característicos (Listgarten, 1965). Células bacterianas como muitas espiroquetas estão localizadas entre as células leucocitárias (Listgarten, 1965; Johnson *e* Engel, 1986; Rowland, 1999), juntamente com acumulações de material fibrilhar (Listgarten, 1965; Johnson *e* Engel, 1986). Segundo o estudo de Courtois *e col.*, em muitas áreas, os PMN, as células epiteliais exfoliadas e os eritrócitos, formam uma barreira incompleta entre a massa bacteriana e o tecido necrótico subjacente. Também foi possível detetar bacilos e organismos fusiformes e bactérias fagocitadas pelos PMN, que apresentavam diferentes níveis de deterioração citológica (Courtois *e col.*, 1983).
3. Zona Necrótica: Zona onde se encontram muitas espiroquetas, juntamente com microrganismos semelhantes a fusiformes (Listgarten, 1965; Rowland, 1999). Esta camada consiste em células tecidulares degeneradas, material fibrilhar, fibras de colagénio (Listgarten, 1965; Courtois *e col.*, 1983), PMN e nas camadas mais profundas, células plasmáticas (Listgarten, 1965; Johnson *e* Engel, 1986).

4. Zona de infiltração espiroquetária: Segundo Listgarten, aproximadamente 250µm abaixo da superfície da região ulcerada, apenas as espiroquetas são observadas. Estas são encontradas em tecidos que parecem preservados, sendo essencialmente de tamanho intermédio e grande (Listgarten, 1965; Johnson e Engel, 1986; Rowland, 1999). As espiroquetas não se encontram apenas no tecido mesenquimal adjacente à úlcera, mas também dentro dos espaços intercelulares do epitélio adjacente à úlcera, formando uma massa densa de microrganismos que os distende, juntamente com PMN (Listgarten, 1965). Segundo Courtois *e col.*, tanto as espiroquetas como outros tipos morfológicos como cocos e bacilos, são detetados abaixo da lâmina basal, numa profundidade entre os 155 a 350µm, com um máximo de profundidade de 400µm para as espiroquetas (Courtois *e col.*, 1983).

Segundo um estudo de Hooper e Seymour, dirigido à histologia do topo da lesão, os resultados mostram que a lesão é dominada por PMN, com células plasmáticas nas camadas mais profundas, o que sugere que a lesão necrótica pode sobrepor-se a uma gengivite pré-existente. O epitélio, na periferia da lesão, apresenta um alargamento dos espaços intercelulares, com destruição das células epiteliais, acompanhado de um denso infiltrado de PMN (Hooper e Seymour, 1979). Este aumento dos espaços intercelulares é corroborado por um estudo de imunofluorescência indireta de uma lesão de PUN, em que é detetada uma abundância intraepitelial de moléculas da matriz extracelular, que enfatiza a presença de espaços intercelulares aumentados no epitélio da lesão (Dannewitz *e col.*, 2006) e que sugerem uma disrupção do aparelho de adesão celular. Ainda foi demonstrada a presença de IgG e C3 entre as células epiteliais, apesar de não ter sido possível estabelecer se representavam deposições de complexos imunes (Hooper e Seymour, 1979).

Os mecanismos celulares e moleculares da ulceração gengival, ainda não foram descritos, porém, os neutrófilos parecem desempenhar um papel importante na patogénese desta patologia (Murayama *e col.*, 1994), tal como referido no estudo de Hooper e Seymour, que sugerem a destruição epitelial como resultado da libertação de enzimas hidrolíticas pelos PMN (Hooper e Seymour, 1979).

VIII. Microbiologia

A nível microbiológico, três grupos de bactérias foram associados às lesões de GUN: Espiroquetas, bactérias Fusiformes e *Prevotella intermedia* (Anual de Periodontologia, 1999). Neste capítulo, os mesmos microrganismos serão descritos, bem como alguns dos seus fatores de virulência que podem ter o potencial para causar o dano tecidual e suprimir a resposta imune do hospedeiro, participando na patogénese da doença periodontal necrosante.

A GUN é uma doença infecciosa. A rápida resolução dos sinais e sintomas pode ser conseguida por uma redução da placa bacteriana, quer por terapia antibiótica, desbridamento mecânico, ou ambos (Rowland *e col.*, 1993; Rowland, 1999; Gmur *e col.*, 2004). Uma doença infecciosa tão específica, deveria estar associada a uma etiologia específica (Rowland, 1999), contudo, a etiologia permanece complexa e não totalmente compreendida (Courtois *e col.*, 1983; Rowland, 1993; Murayama *e col.*, 1994; Gmur *e col.*, 2004). De facto, estudos antimicrobiológicos indicam que os microrganismos presentes ou dominantes na placa, contribuem para os sintomas clínicos, porém, isto não demonstra que estes organismos iniciaram a infeção (Loesche *e col.*, 1982; Rowland, 1999). A flora microbiana da GUN foi originalmente descrita como um complexo fusoespiroquetário por Plaut e Vincent (Johnson *e Engel*, 1986; Murayama *e col.*, 1994; Bermejo *e Pérez*, 2004; Gmur *e col.*, 2004) e, apesar das bactérias fusiformes e das espiroquetas serem frequentemente encontradas em pacientes que não têm GUN, parece ser evidente que estas e outras bactérias, desempenham um papel *major* na patogénese da mesma (Rowland, 1999). Este facto foi suportado por estudos de microscopia eletrónica realizados por Listgarten em 1965 e Heylings em 1967, que confirmaram a presença do complexo fusoespiroquetário e mostraram, em particular, que as espiroquetas e as bactérias fusiformes, eram capazes de penetrar o revestimento epitelial da gengiva e atravessarem por baixo de uma zona necrótica, rica em neutrófilos (Listgarten, 1965; Courtois *e col.*, 1983; Johnson *e Engel*, 1986; Novak, 1999; Rowland, 1999; Gmur *e col.*, 2004). Embora estes estudos sejam contribuições importantes para a literatura periodontal, estes não concordam a respeito do tamanho e/ou espécies de espiroquetas descobertas na profundidade do tecido conjuntivo (Courtois *e col.*, 1983). O papel exato dos microrganismos é difícil de compreender também por informações contraditórias de outros investigadores (Johnson *e Engel*,

1986; Falkler *e col.*, 1987) que na tentativa de cumprir os postulados de Koch's, realizaram experiências com o objetivo de transferir a infecção de um animal para outro (Rowland, 1999), sendo que os vários estudos experimentais estão sumarizados na Tabela 2 em anexo. A relação entre os microrganismos e a iniciação da doença foi difícil de determinar na década de oitenta, sobretudo devido a problemas encontrados em cultivar os patogénios suspeitos individualmente (Loesche *e col.*, 1982; Johnson *e Engel*, 1986); especialmente no que diz respeito às espécies de espiroquetas, que eram destruídas nos procedimentos usados na disrupção da placa (Loesche *e col.*, 1982). Foram poucas as tentativas de cultivar a flora bacteriana de amostras de placa, e estas; com a exceção das extensas investigações de Rosebury e outros investigadores, como Loesche *e Laughon* que conseguiram cultivar com sucesso espiroquetas de tamanho pequeno e intermédio, não foram bem sucedidas (Johnson *e Engel*, 1986).

Informação adicional acerca da natureza bacteriana da GUN foi reportada por Loesche *e col.*, que examinaram amostras de placa de locais com GUN, sendo que estas foram cultivadas quantitativamente sob condições anaeróbias e analisadas ao microscópio para caracterização parcial (Johnson *e Engel*, 1986; Falkler *e col.*, 1987). Os autores reportaram que a flora cultivável era composta por uma “porção constante” e por uma “porção variável”. A flora “constante” foi caracterizada como tendo um número limitado de espécies bacterianas, que estes consideraram ser patogénicas para a GUN e incluía espécies de *Treponemas*, *B. intermedius*, espécies de *Fusobacterium* e espécies do tipo espirilos como as *Selenomonas*. Já a porção “variável” da flora continha um conjunto heterogéneo de vários tipos bacterianos (Johnson *e Engel*, 1986; Falkler *e col.*, 1987; Rowland, 1999). Estes achados vão de encontro às conclusões de Falkler *e col.*, que encontraram valores semelhantes para as espécies cultiváveis e para as espécies da amostra microscópica, diferindo apenas quanto à espécie *B. intermedius* (Falkler *e col.*, 1987). Um estudo mais recente de Gmur *e col.* que utilizaram técnicas de imunofluorescência para identificação, obteve resultados semelhantes às investigações anteriores, sobretudo para as espécies de Espiroquetas e *Fusobacterium* (Gmur *e col.*, 2004). As proporções dos microrganismos da flora constante encontram-se sumarizadas na Tabela 3 em anexo, para os três estudos microbiológicos referidos de amostras da placa bacteriana de pacientes com GUN.

Estes estudos determinaram os bacilos e os cocos como sendo os microrganismos predominantes na contagem microscópica das amostras de placa (Falkler *e col.*, 1987; Gmur *e col.*, 2004), facto que corrobora o estudo de Courtois *e col.*, que detetaram a presença de cocos e pequenos bacilos em tecido não necrótico, numa profundidade igual à atingida pelas espiroquetas (Courtois *e col.*, 1983). No estudo de Loesche *e col.*, as espécies anaeróbias que foram associadas à lesão da GUN, foram seletivamente reduzidas na flora da placa após a resolução da infeção, com um tratamento à base de metronidazol durante uma semana (Loesche *e col.*, 1982, Falkler *e col.*, 1987). Em particular, as proporções dos *B. intermedius*, da *Fusobacterium* sp., das *Treponemas* sp. e das *Selenomonas* sp. foram significativamente reduzidas, coincidindo com a resolução dos sinais clínicos da lesão, o que constitui uma evidência do envolvimento específico destes microrganismos no estágio ulcerativo da GUN, não provando porém o seu papel como iniciadores da mesma (Loesche *e col.*, 1982, Johnson *e Engel*, 1986).

Este estudo microbiológico de Loesche que identifica os *B. intermedius* e as espiroquetas de tamanho intermédio como constituintes *major* da flora associada à GUN, é suportado por um estudo imunológico de Chung *e col.* em 1983, que usando cadeias bacterianas específicas e medindo os níveis de anticorpos por imunofluorescência indireta e pelo método de ELISA; reportaram níveis significativamente aumentados de IgG e de IgM para uma espiroqueta de tamanho intermédio e níveis elevados de IgG para os *B. intermedius* em pacientes com GUN, quando comparados com pacientes com gengivite e pacientes com a gengiva saudável (Rowland, 1999). Os autores afirmaram que estes níveis elevados de anticorpos, sugerem que estas bactérias são agentes patológicos significativos e não meros invasores secundários das lesões de GUN (Johnson *e Engel*, 1986).

Espiroquetas – *Treponema dentícola*

As espiroquetas são bactérias Gram-negativas e únicas morfologicamente, caracterizadas por paredes celulares flexíveis e flagelos internos (Loesche *e Laughon*, 1982). Listgarten e Socransky diferenciaram as espiroquetas orais segundo três critérios ultra-estruturais: o diâmetro do cilindro protoplásmico, a morfologia da membrana externa e o mais importante, o número de flagelos periplásmicos que se originam de cada polo celular (Falkler *e col.*, 1987). As espiroquetas de tamanho pequeno têm um diâmetro entre 0,1-0,25µm, têm entre um a dois flagelos entre cada polo da célula e

compreendem as espécies cultiváveis *Treponema denticola*, *T. macrodentium* e *T. orale*. As espiroquetas de tamanho intermédio têm entre 0,2-0,5 µm em diâmetro, possuem três a vinte flagelos em cada extremidade e são representadas pela *T. vicentii*. As espiroquetas de tamanho grande têm 0,5 µm ou mais em diâmetro, possuem doze a mais de vinte flagelos em cada polo e têm uma membrana externa estruturalmente distinta, estando representadas pela *Borrelia buccale* (Loesche e Laughon, 1982).

A maior parte da informação disponível acerca dos requisitos de crescimento das espiroquetas orais, diz respeito às espécies de tamanho pequeno, sendo que em particular, a fisiologia da *T. denticola* tem sido a mais vastamente estudada (Loesche e Laughon, 1982; Ellen e Galimanas, 2005). A *T. denticola* existe como parte de um complexo e estruturado biofilme, habitando sobretudo as bolsas periodontais mais profundas, não sendo um colonizador precoce da placa subgengival (Dashper e col., 2011). Está reportada a sua localização na superfície de biofilmes bacterianos subgengivais densos, na interface entre o biofilme e o epitélio gengival (Ellen e Galimanas, 2005; Dashper e col., 2011; Fenno, 2012) e é provável que a versatilidade metabólica deste organismo, seja a razão para a sua capacidade de sobrevivência no ambiente competitivo do sulco gengival (Loesche e Laughon, 1982).

Fatores de Virulência:

As características que representam os fatores de virulência *major* da *T. denticola* incluem a sua capacidade de produzir metabolitos citotóxicos, um conjunto de proteínas de superfície para desregular a defesa do hospedeiro, a sua motilidade, a quimiotaxia e a capacidade de penetração nas camadas epiteliais com destruição tecidual (Dashper e col., 2011; Fenno, 2012).

- **Produtos do metabolismo**

As espiroquetas orais cultiváveis produzem uma grande quantidade de substâncias potencialmente tóxicas, como produtos do seu metabolismo, (Loesche e Laughon, 1982) que conseguem penetrar no tecido periodontal e interromper a atividade celular do hospedeiro, bem como afetar a sua resposta imune (Dashper e col., 2011). A *T. denticola* gera produtos como o piruvato, o etanol, o dióxido de carbono, a amónia, a índole e o sulfeto de hidrogénio (**H₂S**) (Sela, 2001; Dashper e col., 2011). O metabolismo da glutatona pela *T. denticola* produz **H₂S**, que parece desempenhar um

papel na destruição tecidual do hospedeiro (Fenno, 2012) dado que é citotóxico para uma variedade de células, incluindo os fibroblastos gengivais e as células epiteliais (Dashper *e col.*, 2011). Este facto é corroborado por estudos recentes que demonstram que o H₂S induz a apoptose das células epiteliais orais, de fibroblastos gengivais e células do ligamento periodontal (Fenno, 2012). Além disto, a produção do H₂S via cistalisina, revelou ser o mecanismo pelo qual a *T. dentícola* destrói a membrana dos eritrócitos, explicando a descrição original de hemolisina (Sela, 2001; Dashper *e col.*, 2011; Visser *e Ellen*, 2011).

- **Proteína Major de Superfície**

A *T. dentícola* possui na sua membrana externa a proteína *major* de superfície, que é a proteína mais abundante da membrana externa e uma das proteínas mais estudadas da *T. dentícola* (Dashper *e col.*, 2011), com propriedades purínicas e de adesão (Chi *e col.*, 2003; Visser *e Ellen*, 2011; Fenno, 2012). Possui por um lado, uma atividade citotóxica formadora de poros contra as células epiteliais e por outro, ansas expostas na superfície que se conseguem ligar a uma variedade de proteínas do hospedeiro (Dashper *e col.*, 2011) como a laminina, a fibronectina, a queratina, o colagénio do tipo I, o fibrinogénio, o ácido hialurónico e a heparina (Dashper *e col.*, 2011; Fenno, 2012). Esta capacidade de aderir e causar dano às células epiteliais, pode iniciar uma sequência de eventos que permite a invasão bacteriana das camadas profundas do tecido conjuntivo periodontal (Sela, 2001).

- **Motilidade e Quimiotaxia**

Tanto a motilidade como a quimiotaxia não são considerados fatores de virulência clássicos das bactérias, porém, no contexto da *T. dentícola* e do seu papel na progressão da doença, é provável que sejam essenciais à virulência desta espiroqueta (Sela, 2001; Dashper *e col.*, 2011). Quase 2% do genoma total da *T. dentícola* é dedicado à motilidade e quimiotaxia (Visser *e Ellen*, 2011), implicando por isso a sua importância na sobrevivência da bactéria nos tecidos do hospedeiro. A sequência genómica da *T. dentícola* prevê que esta tenha um sistema completo de proteínas quimiotáticas necessárias à perceção de sinal, transdução e adaptação (Dashper *e col.*, 2011). Substâncias quimiotáticas para a *T. dentícola* incluem a glucose, o soro e a albumina, que são possíveis indicadores de dano tecidual do hospedeiro (Dashper *e col.*, 2011; Visser *e Ellen*, 2011). O componente quimiorrecetor do sistema, monitoriza o

ambiente e leva à transdução de sinal resultando no movimento flagelar (Visser e Ellen, 2011). Ao contrário do flagelo exposto da maioria das espécies bacterianas móveis (Dashper e col., 2011), o flagelo espiroquetário está localizado no espaço periplásmico, entre a membrana externa e a membrana citoplasmática, estendendo-se dos corpos basais num polo em direção ao polo oposto (Visser e Ellen, 2011). Este flagelo periplásmico facilita a translocação da bactéria em meios altamente viscosos, o que geralmente atrasaria ou imobilizaria a maioria das bactérias com flagelos externos e ainda é um flagelo protegido de efeitos de imobilização por anticorpos específicos contra flagelos, os quais são produzidos pelo hospedeiro em resposta à infeção (Dashper e col., 2011). Estudos reportam que uma quimiotaxia e flagelos mutados levam a disfunções na penetração tecidual (Lux e col., 2001; Visser e Ellen, 2011), o que implica que estes podem ser significativos para a invasão dos tecidos gengivais pela *T. dentícola* e outras espiroquetas orais (Dashper e col., 2011).

- **Penetração epitelial**

A dentisilina é uma protease da membrana externa da *T. dentícola* que resulta de um complexo de 3 lipoproteínas (Fenno, 2012) e que tem atividade do tipo tripsina (Chi e col., 2003; Dashper e col., 2011). Esta protease consegue degradar uma variedade de proteínas, incluindo componentes da membrana basal (colagénio do tipo IV, laminina e fibronectina), proteínas do soro (transferrina, fibrinogénio, IgG e IgA) e péptidos bioativos (Sela, 2001; Chi e col., 2003).

Esta protease é proposta como um fator de virulência *major* da *T. dentícola*, contribuindo para a interrupção ou modulação das vias de transdução de sinal intercelulares e modulando a resposta imune do hospedeiro (Dashper e col., 2011), através da degradação das interleucinas IL-1 β , IL-6, FNT- α e a proteína 1 quimiotática dos monócitos (Dashper e col., 2011; Visser e Ellen, 2011; Fenno, 2012). A dentisilina está descrita como uma proteína que permite a penetração das camadas celulares epiteliais pela *T. dentícola*, através da degradação de proteínas de adesão intercelulares (Dashper e col., 2011; Fenno, 2012). As junções intercelulares ajudam a manter a barreira entre os compartimentos biológicos de ambos os lados dos tecidos, prevenindo a perda de iões, água e moléculas das células. Proteínas específicas formam junções intercelulares e qualquer dano nestas proteínas, pode alterar a permeabilidade da barreira epitelial e promover assim a infeção bacteriana (Chi e col., 2003). A dentisilina

é capaz de aumentar a permeabilidade das junções intercelulares, o que revelou ser um fator chave na penetração e translocação da *T. dentícola* através de camadas celulares (Ellen e Galimanas, 2005; Fenno, 2012). Este efeito de diminuição da resistência epitelial é partilhado pelas vesículas da membrana externa da *T. dentícola*, cujo pequeno tamanho pode facilitar a sua penetração passiva através das camadas epiteliais, e causar dano adicional no tecido adjacente (Chi e col., 2003).

As *Treponemas* possuem um vasto conjunto de fatores de virulência que promove a sua sobrevivência e patogenicidade na bolsa gengival (Visser e Ellen, 2011). A invasão de células epiteliais ou internalização das mesmas, providencia às bactérias um meio rico em nutrientes que as protege parcialmente do sistema imune do hospedeiro (Dashper e col., 2011), o que pode explicar a invasão da *T. dentícola* nas camadas de tecido conjuntivo periodontal, observada em estudos animais e humanos (Sela, 2001).

Segundo um estudo de Falkler e col., após a análise através de microscopia eletrónica da distribuição das espiroquetas na amostra de placa da GUN, oito tipos diferentes de arranjos de flagelos periplásmicos foram observados. A espiroqueta com o arranjo “2-4-2” foi a mais prevalente, ocorrendo em 89% das amostras de placa dos pacientes. É interessante notar que a *T. dentícola* é caracterizada por este arranjo periplásmico, que revelou ser o mais numeroso na placa da GUN dos pacientes deste estudo (Falkler e col., 1987). Mais recentemente, numa série de publicações que usam a reatividade com anticorpos monoclonais para identificação, Riviere e col., documentaram a associação entre espiroquetas orais que se relacionam com a *T. pallidum* e a GUN (Murayama e col., 1994; Ellen e Galimanas, 2005). As espiroquetas orais relacionadas pelos seus patogénios (EORP) são espiroquetas desconhecidas, que são semelhantes em tamanho e forma a outras espiroquetas orais e à *T. pallidum* sbp *pallidum*, reagindo com anticorpos monoclonais que se pensavam reagir apenas com subespécies patogénicas da *T. pallidum* (Riviere e col., 1991). Os autores estudaram a invasão relativa de diferentes espécies de espiroquetas da placa *in vitro*, através de barreiras de membranas e descobriram que as EORP, migravam através das barreiras mais efetivamente que as espécies cultiváveis (Ellen e Galimanas, 2005). Apesar da investigação não estabelecer uma relação causa-efeito (Murayama e col., 1994), as EORP revelaram atingir os tecidos para além da área necrótica numa maior extensão

que a *T. denticola* e com maior frequência, sugerindo por isso, uma possível associação mais forte com o processo da doença (Riviere *e col.*, 1991).

Como Loesche *e* Laughon sugeriram, as espiroquetas associadas à lesão da GUN, podem estar continuamente a tentar invadir os tecidos gengivais em resposta a um gradiente de nutrição (Courtois *e col.*, 1983). De facto, as espiroquetas estão dependentes de produtos derivados do hospedeiro para obterem fatores de crescimento específicos. Se os níveis destes produtos aumentarem no fluido crevicular gengival, as proporções destes microrganismos podem aumentar, dado que estes teriam uma vantagem nutritiva seletiva sobre as outras espécies da placa (Loesche *e col.*, 1982). Esta resposta quimiotática seria facilitada pela motilidade das espiroquetas e a sua pequena dimensão, o que lhes permitiria penetrar o espaço entre as células epiteliais gengivais, mais facilmente do que as outras espécies (Loesche *e* Laughon, 1982).

Avaliação microscópica das lesões:

Estudos de microscopia eletrónica como o de Listgarten, confirmaram a capacidade das espiroquetas de invadir o tecido não necrótico, revelando que os microrganismos invasores eram sobretudo espiroquetas de tamanho grande e intermédio (Listgarten, 1965; Loesche *e* Laughon, 1982; Johnson *e* Engel, 1986; Rowland, 1999). Noutro estudo de microscopia eletrónica mais recente de Courtois *e col.*, as espiroquetas foram detetadas a uma profundidade de penetração maior, com um máximo de profundidade de 400µm abaixo da lâmina basal (Courtois *e col.*, 1983). A invasão bacteriana da lâmina própria pelas mesmas, ocorre aparentemente através de espaços intercelulares expandidos do epitélio adjacente à úlcera (Listgarten, 1965; Hooper *e* Seymour, 1979; Sela, 2001). No que diz respeito à *T. denticola*, este facto é suportado pelo papel da dentisilina (Chi *e col.*, 2003) e pela flexibilidade desta espiroqueta e a sua motilidade, que certamente providenciam as ferramentas físicas necessárias para se mover numa matriz intercelular amorfa do tipo gelatina (Socransky *e* Haffajee, 1991). Quanto à *T. pallidum*, foi demonstrado *in vitro* a sua capacidade de penetrar junções intercelulares pequenas de uma camada de células endoteliais, e migração através do epitélio e do tecido conjuntivo adjacente (Riviere *e col.*, 1991); capacidade facilitada pelo seu mecanismo específico de ligação à superfície externa da fibronectina, que a torna virtualmente indetetável para o sistema de reconhecimento do hospedeiro (Socransky *e* Haffajee, 1991).

Bactérias Fusiformes – *Fusobacterium nucleatum*

A *F. nucleatum* é a espécie do género *Fusobacterium*, que pertence à família dos *Bacteroidaceae* e é uma bactéria Gram-negativa anaeróbia, mas que consegue crescer na presença de oxigénio até 6% (Bolstad *e col.*, 1996). Esta é uma das bactérias mais estudadas como implicadas na doença periodontal e numericamente dominante nos biofilmes da placa bacteriana, sendo uma das primeiras bactérias Gram-negativas a estabelecer-se no biofilme bacteriano (Signat *e col.*, 2011). Esta bactéria detém potencial patogénico devido ao seu número e prevalência na doença periodontal (Bolstad *e col.*, 1996), produção de produtos irritantes (Bartold *e col.*, 1991; Bolstad *e col.*, 1996), sinergismo com outras bactérias nas infeções mistas (Bolstad *e col.*, 1996), capacidade para co agregar com outros periodontopatogénios, atuando como uma ponte entre colonizadores precoces e tardios da superfície dentária, (Bolstad *e col.*, 1996; Signat *e col.*, 2011) e ainda devido a um papel imunossupressor (Huynh *e col.*, 2011; Signat *e col.*, 2011).

Fatores de virulência:

- **Metabolitos Tóxicos**

O produto *major* do metabolismo dos péptidos ou dos carboidratos pelas Fusobactérias é o butirato, juntamente com o acetato e o lactato, e em menores quantidades, o propionato, succinato, formato e pequenas cadeias de álcoois. Os efeitos que os produtos do metabolismo da *F. nucleatum* provocam no hospedeiro, encontram-se sumarizados na tabela 4 em anexo. Apesar do efeito dos metabolitos não ser suficiente para causar a morte celular, a inibição da proliferação dos fibroblastos gengivais pode ser grave, potenciando um comprometimento da capacidade de cicatrização (Bartold *e col.*, 1991; Bolstad *e col.*, 1996). Além disto, a propensão para a acumulação dos metabolitos tóxicos nas bolsas periodontais infetadas e o provável fácil acesso aos tecidos conjuntivos gengivais adjacentes, sugere o papel significativo destes componentes na patogénese da doença periodontal (Bartold *e col.*, 1991).

- **Co agregação**

A *F. nucleatum* é considerada um organismo chave na maturação da placa bacteriana devido à sua extensa capacidade de co agregação (Diaz *e col.*, 2002). Este

microrganismo, é considerado uma ponte entre colonizadores precoces e tardios. Os colonizadores precoces, aderem à película dentária e co agregam com outros colonizadores iniciais e com a *F. nucleatum*. Os colonizadores tardios, co agregam quase exclusivamente com a *F. nucleatum*, que parece desempenhar um papel importante por interligar estas co agregações com os colonizadores iniciais (Bolstad *e col.*, 1996). Os fusiformes, que co agregam com o maior número de géneros bacterianos testados (Bolstad *e col.*, 1996; Sheikhi *e col.*, 2000), não co agregam entre si e não são móveis, por isso, podem depender de contatos célula-célula para garantirem o ambiente metabólico necessário (Bolstad *e col.*, 1996).

A *F. nucleatum* pode ser um mediador da co agregação entre espécies anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas, o que pode ser o mecanismo pelo qual microrganismos anaeróbios estritos, como a *P. gingivalis*, sobrevivem sob condições aeróbias (Diaz *e col.*, 2002). É assim provável que a *F. nucleatum* desempenhe um papel importante no estabelecimento da *P. gingivalis* na bolsa periodontal, e que a co agregação seja um pré requisito para uma colonização de sucesso pela última (Bolstad *e col.*, 1996). Outra interação possível entre os dois microrganismos inclui a presença de enzimas proteolíticas na *P. gingivalis*, que clivam proteínas em péptidos e que por isso, aumentam as fontes de energia para a *F. nucleatum* (Diaz *e col.*, 2002) que tem uma atividade proteolítica intrínseca fraca; corroborando o facto de que na presença da primeira, a capacidade da última para hidrolisar proteínas, aumente aproximadamente em 30% (Bolstad *e col.*, 1996).

- **Resposta Inflamatória e Penetração dos tecidos**

A *F. nucleatum* estimula diferentes tipos celulares a produzir citocinas como a IL-1, IL-6, TNF- α e TGF- β . A estas citocinas produzidas localmente, é atribuída a responsabilidade pela perda óssea e destruição do tecido conjuntivo que ocorre na doença periodontal (Bolstad *e col.*, 1996). Também os neutrófilos, enquanto as primeiras linhas de defesa contra patógenos periodontais (Bolstad *e col.*, 1996; Sheikhi *e col.*, 2000; Signat *e col.*, 2011), contribuem para o dano tecidular, pois são ativados pela *F. nucleatum*, aumentando a produção e libertação de radicais livres de oxigénio e enzimas lisossómicas (Bolstad *e col.*, 1996; Sheikhi *e col.*, 2000). A *F. nucleatum* induz ainda a secreção por células epiteliais ativadas, de enzimas proteolíticas, incluindo metaloproteinases (MMP), que modificam as reações inflamatórias e facilitam

a migração celular. As fusobactérias têm capacidade para estimular a secreção da MMP-9, MMP-13 e da IL-8 (Signat *e col.*, 2011). A interleucina IL-8 é uma quimiotaxina específica para os neutrófilos (Han *e col.*, 2000; Sheikhi *e col.*, 2000; Signat *e col.*, 2011), sendo que altas concentrações desta citocina causam desgranulação dos grânulos primários dos neutrófilos, libertando elastase e catepsina G (Sheikhi *e col.*, 2000). Além da elastase, uma serino protease que consegue degradar moléculas importantes como colagénio e proteoglicanas, e que é libertada pelos neutrófilos durante a sua ativação pela *F. nucleatum* (Sheikhi *e col.*, 2000); esta bactéria também secreta proteases que degradam proteínas da matriz extracelular como o fibrinogénio e a fibronectina, assim como colagénio do tipo I e IV (Signat *e col.*, 2011). A membrana basal, localizada entre o epitélio sulcular e o tecido conjuntivo subjacente, é a última barreira à translocação bacteriana através da bolsa para o tecido conjuntivo (Bolstad *e col.*, 1996). Segundo um estudo de Ji *e col.*, a *F. nucleatum* foi a bactéria com maior capacidade de invasão das células epiteliais gengivais, quando comparada com outros patogénios periodontais como a *P. gingivalis*, *T. dentícola* e *P. intermedia* (Ji *e col.*, 2010). Este facto corrobora um estudo anterior, que confirma a elevada capacidade invasiva da *F. nucleatum* tanto para uma cultura de células epiteliais gengivais humanas, como para uma linhagem de células epiteliais orais e onde a cadeia da bactéria mutada demonstrou deficiências de adesão e incapacidade na invasão celular, o que pressupõe a necessidade de componentes bacterianos nestes processos (Han *e col.*, 2000). Além disto, a capacidade da *F. nucleatum* de se aderir à membrana basal (Socransky *e Haffajee*, 1991) e de a degradar *in vivo*, deve ser considerada um passo importante para a potencial invasão ativa e passiva dos tecidos gengivais (Bolstad *e col.*, 1996). Assim, a *F. nucleatum* pode ganhar acesso ao tecido conjuntivo e agravar a destruição tecidual quer indiretamente, por indução de potentes respostas inflamatórias, quer diretamente através de proteases (Ji *e col.*, 2010).

- **Papel Imunossupressor**

Uma das propriedades que ilustra o papel patogénico da *F. nucleatum*, é a sua capacidade imunossupressora, propriedade partilhada por bactérias periodontopatogénicas do complexo vermelho (Signat *e col.*, 2011). Estudos demonstram que isto se deve à capacidade deste organismo de induzir a morte celular por apoptose de células mononucleares na circulação periférica e de células

polimorfonucleares (Jewett *e col.*, 2000; Huynh *e col.*, 2011; Signat *e col.*, 2011). Em particular, está reportado que a *F. nucleatum* é capaz de inibir muitas funções imunológicas (Jewett *e col.*, 2000), como as respostas dos linfócitos T aos mitogénios e antigénios (Bolstad *e col.*, 1996; Huynh *e col.*, 2011); sendo que Shenker *e* Dirienzo identificaram uma proteína da *F. nucleatum* inibidora, como a responsável pelo efeito imunossupressor, inibindo a progressão das células T no ciclo celular (Jewett *e col.*, 2000; Huynh *e col.*, 2011; Signat *e col.*, 2011). A *F. nucleatum* também é capaz de inibir as funções dos linfócitos B (Signat *e col.*, 2011), como elucida um estudo de Mangan *e col.*, em que monócitos supressores inibem a ativação policlonal dos linfócitos B, na presença desta bactéria (Mangan *e col.*, 1984). Foi demonstrado que a *F. nucleatum* se agrega às células imunitárias em poucos minutos e, quando a bactéria é destruída pelo calor, não só perde a capacidade de agregação, como a capacidade indutora de apoptose celular é significativamente diminuída (Jewett *e col.*, 2000; Huynh *e col.*, 2011). Os resultados sugerem que a agregação pode ser um passo necessário e suficiente na indução da morte celular imunitária pela bactéria (Huynh *e col.*, 2011; Signat *e col.*, 2011). Parece que esta capacidade para agregar com as células imunitárias é uma característica específica da *F. nucleatum*, pois o mesmo efeito não foi observado com outras espécies bacterianas orais (Jewett *e col.*, 2000; Huynh *e col.*, 2011). A indução da apoptose tanto nas células mononucleares como nos PMN pela *F. nucleatum*, demonstra a capacidade deste organismo de criar uma paralisia generalizada no sistema imune, o que pode contribuir para o recrutamento de outras bactérias patogénicas e subsequentemente para a iniciação e progressão da doença periodontal (Jewett *e col.*, 2000; Signat *e col.*, 2011).

Avaliação microscópica das lesões:

Segundo um estudo clássico de microscopia eletrónica de Listgarten em 1965, no local de maior penetração bacteriana, aproximadamente 250 µm abaixo da superfície da lesão ulcerada, apenas as espiroquetas foram observadas (Courtois *e col.*, 1983). Somente até à zona necrótica, foram encontrados microrganismos comparáveis em tamanho e em forma com os fusiformes (Listgarten, 1965). Num estudo mais recente, tanto as espiroquetas como outros microrganismos são capazes de infiltrar o tecido conjuntivo viável (Rowland, 1999). Neste estudo, em que foram observadas biópsias de lesões de 8 pacientes com GUN, os fusiformes foram observados a invadir a lâmina

própria através de espaços intercelulares expandidos do epitélio do sulco e com uma menor extensão através do epitélio oral, juntamente com um infiltrado celular de neutrófilos e linfócitos. Tanto as espiroquetas como outros tipos morfológicos de bactérias como cocos, bacilos e fusiformes, foram observados abaixo da lâmina basal a uma profundidade variável entre 155 a 350 μm , com um máximo de invasão de 400 μm apenas para as espiroquetas (Courtois *e col.*, 1983).

Bacteróides pigmentados de negro – *Prevotella intermedia*

Os bacteróides pigmentados de negro (BPN) são bacilos Gram-negativos anaeróbios, que produzem um pigmento castanho ou preto quando cultivados em placas de ágar com sangue (Van Winkelhoff *e col.*, 1988; Van Steenbergem *e col.*, 1989; Teanpaisan *e col.*, 1995) e que estão associados a gengivites, periodontites, infeções endodônticas e abscessos de origem odontogénica. Estudos de cultura sugerem um papel específico das várias espécies de bacteróides nos diferentes tipos de infeção (Van Winkelhoff *e col.*, 1988). A virulência dos BPN foi estudada em múltiplos modelos animais, sendo que a *B. gingivalis* (atualmente *P. gingivalis*) foi considerada a mais virulenta quando comparada com outras espécies de BPN (Van Winkelhoff *e col.*, 1988; Steenbergem *e col.*, 1989); estando maioritariamente associada a periodontites crónicas, mas também sendo implicada na periodontite agressiva localizada (Darby *e Curtis*, 2001). A *P. intermedia* (anteriormente *Bacteroides melaninogenicus subsp. intermedius*, posteriormente *Bacteroides intermedius*) tem sido frequentemente encontrada em pacientes com periodontite agressiva localizada e generalizada (Darby *e Curtis*, 2001), periodontite crónica, GUN e gengivite associada à gravidez, sendo-lhe atribuída uma patogenicidade significativa nestas condições (Teanpaisan *e col.*, 1995). Além das infeções na cavidade oral, os BPN também são encontrados nas membranas mucosas, especialmente nas amígdalas (Van Winkelhoff *e col.*, 1988; Van Steenbergem *e col.*, 1989). Segundo um estudo de Van Winkelhoff *e col.*, que compararam a microflora da língua e das amígdalas de indivíduos com e sem doença periodontal, os *B. intermedius* foram significativamente isolados da língua de pacientes com doença periodontal (Van Winkelhoff *e col. in* Steenbergem *e col.*, 1989). De acordo com um estudo de Teanpaisan *e col.*, a *P. intermedia*, não esteve mais presente em frequência nos locais com doença periodontal (15,5%) do que em locais com saúde (20,5%), embora colónias mais numerosas fossem sempre obtidas a partir de locais com a doença. Esta observação

sugere que a *P. intermedia* é um patógeno oportunista, corroborando outros estudos, em que números aumentados desta bactéria foram encontrados nas bolsas periodontais, estando presente porém também, em locais saudáveis (Teanpaisan *e col.*, 1995).

Fatores de virulência:

- **Adesão e Relações interbacterianas**

Os microrganismos com potencial patogénico na cavidade oral têm de reunir um conjunto de propriedades. Um dos primeiros requisitos é a propriedade de adesão. Foi demonstrado que os BPN possuem *pilis* de diferente natureza e que os *B. intermedius* se conseguem aderir às superfícies epiteliais bucais e creviculares (Van Winkelhoff *e col.*, 1988). Esta adesão bacteriana pode ser influenciada pela produção de enzimas extracelulares por organismos que descobrem locais de ligação para outros organismos. Tal é o caso do *S. sanguis* e *S. mitis* que se ligam em níveis comparáveis às células epiteliais intatas, assim como a *P. intermedia*. O tratamento das células epiteliais com neuraminidases, remove o ácido siálico, o que elimina o sítio de ligação dos *Streptococci*, mas que revela resíduos de galactosil aos quais as espécies de Bacteróides se podem ligar. Este facto está de acordo com a descoberta de que células obtidas de bolsas periodontais profundas têm menores níveis de ácido siálico do que células obtidas de sulcos saudáveis (Socransky *e Haffajee*, 1991) e de que as proporções da *P. intermedia* são mais elevadas nas bolsas periodontais do que nos locais saudáveis (Teanpaisan *e col.*, 1995).

- **Interações com o Hospedeiro**

Após adesão e crescimento na cavidade oral, a célula bacteriana tem de competir com outras espécies que também colonizam esse *habitat* e tem de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Socransky *e Haffajee*, 1991). Os BPN podem ativar tanto a via clássica como a via alternativa do sistema complemento e o lipopolissacárido dos Bacteróides ativa fortemente o sistema complemento e a resposta quimiotática dos PMN (Van Winkelhoff *e col.*, 1988). A presença de anticorpos específicos na área subgengival representa uma ameaça aos potenciais patógenos. O anticorpo pode agir impedindo a adesão bacteriana ou, tornando a célula bacteriana suscetível aos vários mecanismos fagocitários ou de lise celular (Socransky *e Haffajee*,

1991). Espécies como a *P. intermedia*, desenvolveram mecanismos que lhes permitem evadir-se dos efeitos dos anticorpos, pois possuem proteases que degradam completamente a IgA e a IgG (Van Winkelhoff *e col.*, 1988; Socransky *e* Haffajee, 1991), o que pode ser significativo na adesão às superfícies mucosas orais (Van Winkelhoff *e col.*, 1988) e na proteção contra o próprio organismo ou outras espécies do mesmo ambiente (Socransky *e* Haffajee, 1991). Este facto é suportado por estudos que reportam que a *P. intermedia* apresenta uma resistência notável às propriedades bactericidas do soro, em comparação com outras espécies de BPN (Van Winkelhoff *e col.*, 1988). Além de proteases que degradam imunoglobulinas, a *P. intermedia* apresenta diversos tipos de proteases capazes de degradar substratos do tecido do hospedeiro, como a elastina e fatores do sistema complemento (Saito *e col.*, 2001). Também uma enzima com atividade do tipo Fosfolipase A tem sido associada à *P. intermedia* (Van Winkelhoff *e col.*, 1988; Socransky *e* Haffajee, 1991), sendo que esta enzima detém o potencial de causar dano às células epiteliais (Beem *e col.*, 1998). Consequentemente, esta bactéria pode induzir uma inflamação que se traduz numa simples gengivite ou numa doença periodontal mais severa através da destruição direta do periodonto e de distúrbios da resposta imune (Saito *e col.*, 2001).

- **Efeitos Imunossupressores e Hemolíticos**

Foi demonstrado que a *P. intermedia* produz substâncias capazes de suprimir os mecanismos de defesa do hospedeiro (Socransky *e* Haffajee, 1991). Segundo um estudo de Shenker *e col.*, a bactéria inibiu a proliferação de linfócitos B e T em resposta a mitogénios e antigénios, que se refletiu por alterações no DNA, RNA e síntese proteica. Esta imunossupressão mediada pela bactéria, pode contribuir para a patogénese da doença periodontal, alterando a natureza e as consequências da interação entre hospedeiro-microrganismo (Shenker *e col.*, 1991). Além de uma ação imunossupressora, foi demonstrado que a *P. intermedia* tem também uma atividade hemolítica, pois esta bactéria necessita de Ferro para o crescimento celular e a hemina e a hemoglobina podem ser fontes deste nutriente para este microrganismo. Além de satisfazer os requerimentos metabólicos de Ferro, a hemolisina também é responsável por diminuir a resposta quimiotática de leucócitos periféricos (Beem *e col.*, 1998). Tal como reportado por Leung *e col.*, a *P. intermedia* aglutina fortemente com eritrócitos de ratos e humanos (Leung *e col.*, 1989); deste modo, a hemaglutinação pode ser um

mecanismo preliminar para permitir uma ação hemolítica secundária na aquisição de componentes do grupo heme. A produção de hemolisina tem sido descrita como um fator de virulência em periodontopatogénios como a *P. gingivalis* e a *T. dentícola* (Beem *e col.*, 1998), o que sustenta o facto de que as bactérias com atividade hemolítica estão em números mais elevados nos locais com doença na cavidade oral (Hillman *e col.*, 1993).

- **Produtos do metabolismo**

As espécies de *Prevotella* produzem maioritariamente pequenas cadeias de ácidos gordos como o succinato, acetato e isovalerato, com uma pequena quantidade de isobutirato e grandes quantidades de amónia, que apresentam capacidades inibidoras da função e proliferação dos neutrófilos (Van Winkelhoff *e col.*, 1988), linfócitos T, fagócitos, fibroblastos gengivais e fibroblastos do ligamento periodontal. A amónia tem sido associada a alta citotoxicidade para com os neutrófilos (Saito *e col.*, 2011) e a uma potente inibição da proliferação dos fibroblastos gengivais (Bartold *e col.*, 1991). Dado que estes produtos do metabolismo possuem baixo peso molecular em comparação com outros fatores citotóxicos como proteases bacterianas e lipopolissacáridos (Saito *e col.*, 2011), foi sugerido a fácil penetração no tecido periodontal saudável com a expressão da sua citotoxicidade (Bartold *e col.*, 1991; Saito *e col.*, 2011). Apesar da importância destes componentes na patogénese da doença não ser totalmente conhecida, mesmo pequenas inibições do metabolismo celular, podem afetar adversamente o balanço que é necessário para manter a integridade estrutural do tecido periodontal (Socransky *e Haffajee*, 1991).

Avaliação microscópica das lesões:

Segundo o estudo de Listgarten em 1965, no local de maior penetração bacteriana, aproximadamente 250 µm abaixo da superfície da lesão ulcerada, apenas as espiroquetas foram observadas (Courtois *e col.*, 1983) e, essencialmente os mesmos achados foram reportados dois anos mais tarde por Heylings (Rowland, 1999). Em ambos os estudos, pouca menção é feita acerca do potencial invasivo de outros tipos morfológicos de microrganismos. Desde que Frank demonstrou as capacidades invasivas de diferentes tipos morfológicos de bactérias, em bolsas periodontais profundas e bem estabelecidas, parece ser razoável esperar um achado semelhante na

lesão de GUN (Courtois *e col.*, 1983). De facto, um estudo de Courtois *e col.*, também detetou cocos e bacilos, além das espiroquetas, dentro da região do tecido conjuntivo não necrótico adjacente (Rowland, 1999), abaixo da membrana basal, numa profundidade entre os 155 a 350µm (Courtois *e col.*, 1983). Segundo um estudo de Allenspach-petrzilka *e* Guggenheim, a *B. melaninogenicus ssp. intermedius* foi encontrada no epitélio oral e no tecido conjuntivo de ratos gnotobióticos, através de observação microscópica, após infeção com a bactéria (Allenspach-petrzilka *e* Guggenheim, 1982). Também um estudo *in vitro* mais recente, demonstrou a capacidade da *P. intermedia* de invadir uma linha de células epiteliais orais, relativamente a outros isolados da mesma espécie e sugeriu que o tipo C de fímbria (maior diâmetro) e um rearranjo do citoesqueleto, são necessários para a invasão desta bactéria (Dorn *e col.*, 1998).

IX. Conclusão

A Gengivite Ulcerativa Necrosante é uma patologia cuja apresentação clínica, etiologia e patogénese, a tornam única e merecedora de uma classificação separada e diferente, no âmbito do Sistema de Classificação das Doenças Periodontais proposto por Armitage. Na patogénese da patologia, existem por um lado, fatores relacionados com a microbiota oral com processos de invasão, e por outro, fatores relacionados com o hospedeiro. Fatores locais como uma higiene oral precária e o fumo do tabaco (como contribuinte para a isquémia local) foram implicados, contudo, fatores sistémicos como o stress emocional, a malnutrição, o tabaco e algum grau de imunossupressão, podem ser necessários para diminuir as defesas do hospedeiro e permitir o desenvolvimento da infeção. Embora os estudos de microscopia ótica e eletrónica de amostras da placa e antimicrobianos, suportem o papel das Espiroquetas, bactérias Fusiformes e *P. intermedia* como patógenos predominantes na flora da lesão e responsáveis pelos sintomas clínicos durante o estágio ulcerativo da mesma, eles não comprovam que estes anaeróbios específicos iniciam a infeção, ou seja; o(s) patógeno(s) periodontal(ais) definitivo(s) implicado(s) na instalação e progressão da GUN, permanece(m) desconhecido(s). A lesão histológica fundamental da GUN compreende uma úlcera no epitélio estratificado escamoso, que se encontra destruído e com um abundante infiltrado inflamatório de PMN. A lesão apresenta tipicamente quatro camadas

histopatológicas, descritas originalmente por Listgarten, em que se observa uma invasão de espiroquetas e outras bactérias para o tecido conjuntivo viável. Esta forma de invasão, provavelmente envolve um conjunto de fatores de virulência, que causam dano no epitélio (levando à ulceração), destroem a matriz intercelular do tecido conjuntivo, envolvem uma motilidade ativa de certas bactérias e mais importante, previnem os organismos de serem fagocitados com sucesso e destruídos, dentro dos tecidos. É concebível que o dano tecidular possa resultar de uma reação imunopatológica, desencadeada por toxinas bacterianas ou produtos do seu metabolismo, e que é mantida até que as bactérias sejam eliminadas ou suprimidas. No entanto, a dificuldade em cultivar as espiroquetas na década de oitenta, a rápida instalação da infecção que impede o conhecimento da proporção dos microrganismos durante o estágio de formação da lesão e a pouca atenção dada à histopatologia do topo da lesão, que é o sítio ativo de destruição, têm contribuído para lacunas no conhecimento acerca da etiologia específica, patogénese e mecanismo molecular que está na base da ulceração gengival. Atualmente a GUN é considerada uma patologia multifatorial: existem por um lado, microrganismos oportunistas que apesar de serem encontrados em pacientes com patologias periodontais não associadas à necrose, parecem desempenhar um papel *major* na patogénese da GUN; por outro, está frequentemente presente pelo menos um fator de uma tríade de fatores predisponentes que se interrelacionam, como o stress, o tabaco ou algum grau de imunossupressão do hospedeiro, que provavelmente têm um efeito sistémico comum e que culmina com a diminuição local da resistência gengival, que por sua vez, facilitará a invasão dos tecidos pelos microrganismos dominantes. Contudo, o peso que cada um destes fatores desempenha no desenvolvimento da doença e os mecanismos pelos quais operam, não se encontram bem esclarecidos.

Mais estudos são necessários para definir a complexa interação entre a etiologia microbiana, mecanismo patogénico e o padrão histológico da lesão da GUN.

Bibliografia:

Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol* 2000. 2002; 29:153-76.

Allenspach-Petrzilka GE, Guggenheim B. *Bacteroides melaninogenicus* ss. *intermedius* invasion of rat gingival tissue. *J Periodontal Res*. 1982 Sep; 17(5):456-9.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6.

Barnes GP, Bowles WF 3rd, Carter HG. Acute necrotizing ulcerative gingivitis: a survey of 218 cases. *J Periodontol*. 1973 Jan; 44(1):35-42.

Bartold PM, Gully NJ, Zilm PS, Rogers AH. Identification of components in *Fusobacterium nucleatum* chemostat-culture supernatants that are potent inhibitors of human gingival fibroblast proliferation. *J Periodontal Res*. 1991 Jul; 26(4):314-22.

Beem JE, Nesbitt WE, Leung KP. Identification of hemolytic activity in *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol*. 1998 Apr; 13(2):97-105.

Bermejo-Fenoll A, Sánchez-Pérez A. Necrotising periodontal diseases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004;9 Suppl:114-9; 108-14.

Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Jan; 9(1):55-71.

Chi B, Qi M, Kuramitsu HK. Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Res Microbiol*. 2003 Nov; 154(9):637-43.

Chung CP, Nisengard RJ, Slots J, Genco RJ. Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol*. 1983 Sep; 54(9):557-62.

Clarke NG, Shephard BC, Hirsch RS. The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1981 Dec; 52(6):577-82.

Cogen RB, Stevens AW Jr, Cohen-Cole S, Kirk K, Freeman A. Leukocyte function in the etiology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J Periodontol. 1983 Jul; 54(7):402-7.

Consensus report: Necrotizing Periodontal Diseases. Ann Periodontol. 1999; 4:78.

Courtois GJ 3rd, Cobb CM, Killoy WJ. Acute necrotizing ulcerative gingivitis. A transmission electron microscope study. J Periodontol. 1983 Nov; (11):671-9.

Dannewitz, B.; Eickholz, P.; Kohl, A.; Komposch, G.; Tomakidi, P. Cambio moleculares en el epitelio gingival asociados a la periodontitis ulcerativa necrotizante: Informe de un caso. Revista Internacional de Odontología Restauradora & Periodoncia, 2006; 10 (2); 199-204.

Darby I, Curtis M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. Periodontol 2000. 2001; 26:33-53.

Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. J Dent Res. 2011 Jun; 90(6):691-703.

Dennison DK, Smith B, Newland JR. Immune responsiveness and ANUG. J Dent Res; 1985; 64:197.

Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH. *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. Microbiology. 2002 Feb; 148(Pt 2):467-72.

Dorn BR, Leung KL, Progulske-Fox A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. Infect Immun. 1998 Dec; 66(12):6054-7.

Ellen RP, Galimanas VB. Spirochetes at the forefront of periodontal infections. Periodontol 2000. 2005;38:13-32.

Falkler WA Jr, Martin SA, Vincent JW, Tall BD, Nauman RK, Suzuki JB. A clinical, demographic and microbiologic study of ANUG patients in an urban dental school. J Clin Periodontol. 1987 Jul; 14(6):307-14.

Fenno JC. *Treponema denticola* interactions with host proteins. J Oral Microbiol. 2012;4.

Giddon DB, Zackin SJ, Goldhaber P. Acute necrotizing ulcerative gingivitis in college students. J Am Dent Assoc. 1964 Mar; 68:380-6.

Gmür R, Wyss C, Xue Y, Thurnheer T, Guggenheim B. Gingival crevice microbiota from Chinese patients with gingivitis or necrotizing ulcerative gingivitis. Eur J Oral Sci. 2004 Feb; 112(1):33-41.

Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H, Genco RJ. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. Infect Immun. 2000 Jun; 68(6):3140-6

Hillman JD, Maiden MF, Pfaller SP, Martin L, Duncan MJ, Socransky SS. Characterization of hemolytic bacteria in subgingival plaque. J Periodontal Res. 1993 May;28(3):173-9.

Hooper PA, Seymour GJ. The histopathogenesis of acute ulcerative gingivitis. J Periodontol. 1979 Aug; 50(8):419-23.

Horning GM, Cohen ME. Necrotizing ulcerative gingivitis, periodontitis, and stomatitis: clinical staging and predisposing factors. J Periodontol. 1995 Nov; 66(11):990-8.

Huynh T, Kapur RV, Kaplan CW, Cacalano N, Kinder Haake S, Shi W, Sieling P, Jewett A. The role of aggregation in *Fusobacterium nucleatum*- induced immune cell death. J Endod. 2011 Nov; 37(11):1531-5.

Ji S, Shin JE, Kim YC, Choi Y. Intracellular degradation of *Fusobacterium nucleatum* in human gingival epithelial cells. Mol Cells. 2010 Dec; 30(6):519-26.

Jiménez M, Baer PN. Necrotizing ulcerative gingivitis in children: a 9 year clinical study. J Periodontol. 1975 Dec; 46(12):715-20.

Johnson BD, Engel D. Acute necrotizing ulcerative gingivitis. A review of diagnosis, etiology and treatment. J Periodontol. 1986 Mar; 57(3):141-50.

Kardachi BJ, Clarke NG. Aetiology of acute necrotising ulcerative gingivitis: a hypothetical explanation. J Periodontol. 1974 Nov; 45(11):830-2.

Leung KP, Fukushima H, Sagawa H, Walker CB, Clark WB. Surface appendages, hemagglutination, and adherence to human epithelial cells of *Bacteroides intermedius*. *Oral Microbiol Immunol*. 1989 Dec;4(4):204-10.

Listgarten MA. Electron microscopic observations on the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol*. 1965 Jul-Aug;36:328-39.

Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol*. 1982 Apr; 53(4):223-30.

Loesche, W. J., and Laughon, B. E.: Role of spirochetes in periodontal disease. R.J. Genco and S.E. Mergenhagen (eds), *Host-Parasite Interactions in Periodontal Diseases*, pp 62-75. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1982.

Lopez R, Fernandez O, Jara G, Baelum V. Epidemiology of necrotizing ulcerative gingival lesions in adolescents. *J Periodontal Res*. 2002 Dec; 37(6):439-44.

Lux R, Miller JN, Park NH, Shi W. Motility and chemotaxis in tissue penetration of oral epithelial cell layers by *Treponema denticola*. *Infect Immun*. 2001 Oct; 69(10):6276-83.

Mangan DF, Won T, Lopatin DE. Monocyte suppression of *Fusobacterium nucleatum*-induced human polyclonal B-lymphocyte activation. *Infect Immun*. 1984 Nov; 46(2):332-9.

Maupin CC, Bell WB. The relationship of 17-hydroxycorticosteroid to acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol*. 1975 Dec; 46(12):721-2.

Murayama Y, Kurihara H, Nagai A, Dompkowski D, Van Dyke TE. Acute necrotizing ulcerative gingivitis: risk factors involving host defense mechanisms. *Periodontol* 2000. 1994 Oct; 6:116-24.

Novak MJ. Necrotizing ulcerative periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999 Dec; 4(1):74-8.

Pindborg JJ. Influence of service in armed forces on incidence of gingivitis. *J Am Dent Assoc*. 1951 May; 42(5):517-22.

Riviere GR, Weisz KS, Simonson LG, Lukehart SA. Pathogen-related spirochetes identified within gingival tissue from patients with acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Infect Immun*. 1991 Aug; 59(8):2653-7.

Rowland RW, Mestecky J, Gunsolley JC, Cogen RB. Serum IgG and IgM levels to bacterial antigens in necrotizing ulcerative gingivitis. J Periodontol. 1993 Mar; 64(3):195-201.

Rowland RW. Necrotizing ulcerative gingivitis. Ann Periodontol. 1999 Dec; 4(1):65-73.

Saito K, Takahashi N, Horiuchi H, Yamada T. Effects of glucose on formation of cytotoxic end-products and proteolytic activity of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res. 2001 Dec; 36(6):355-60.

Sayers NM, James JA, Drucker DB, Blinkhorn AS. Possible potentiation of toxins from *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, and *Porphyromonas gingivalis* by cotinine. J Periodontol. 1999 Nov; 70(11):1269-75.

Sela MN. Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. Crit Rev Oral Biol Med. 2001; 12(5):399-413.

Shannon IL, Kilgore WG, O'Leary TJ. Stress as a predisposing factor in necrotizing ulcerative gingivitis. J Periodontol. 1969 Apr; 40(4):240-2.

Sheikhi M, Gustafsson A, Jarstrand C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum*-activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. J Clin Periodontol. 2000 Oct; 27(10):758-62.

Shenker BJ, Vitale L, Slots J. Immunosuppressive effects of *Prevotella intermedia* on In vitro Human Lymphocyte Activation. Infect Immun. 1991 Dec; 59(12):4583-9.

Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. Curr Issues Mol Biol. 2011; 13(2):25-36. Epub 2011 Jan 10.

Singer RE, Buckner BA. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. Infect Immun. 1981 May; 32(2):458-63.

Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. J Periodontal Res. 1991 May; 26(3 Pt 2):195-212.

Teanpaisan R, Douglas CW, Walsh TF. Characterisation of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites. *J Periodontal Res.* 1995 Jul; 30(4):245-51.

Van Steenberg TJ, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U, de Graaff J. Taxonomy, virulence and epidemiology of black-pigmented *Bacteroides* species in relation to oral infections. *Infection.* 1989 May-Jun; 17(3):194-6.

Van Winkelhoff AJ, Van Steenberg TJ, de Graaff J. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J Clin Periodontol.* 1988 Mar; 15(3):145-55.

Visser MB, Ellen RP. New insights into the emerging role of oral spirochetes in periodontal disease. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Apr; 17(4):502-12.

Wilson JR. Etiology and diagnosis of bacterial gingivitis including Vincent's disease. *J Am Dent Assoc.* 1952 Jun; 44(6):671-3.

Anexos

Tabela 1. Características de diagnóstico secundárias da Gengivite Ulcerativa Necrosante.

Sinais/Sintomas clínicos secundários	Referências que suportam	Conclusões
Pseudomembrana	<p>Horning e Cohen (1995)</p> <p>Falkler e col. (1987); Suzuki e col. (in Johnson e Engel, 1986)</p> <p>Murayama e col. (1994); Novak (1999); Albandar e Tinoco (2002)</p>	<p>Característica bastante fiável, encontrada em 88% dos pacientes com GUN</p> <p>Observada em 85% dos pacientes com GUN</p> <p>Incluída nas características clínicas, mas não exclusiva</p>
Halitose (<i>foetor ex ore</i>)	<p>Horning e Cohen (1995)</p> <p>Courtois e col. (1983)</p> <p>Suzuki e col. (in Johnson e Engel, 1986); Falkler e col. (1987)</p> <p>Murayama e col. (1994); Novak (1999); Albandar e Tinoco (2002)</p>	<p>Característica encontrada em 87% dos pacientes com GUN</p> <p>100% dos pacientes com GUN apresentam halitose</p> <p>Hálito fétido em 97% dos pacientes examinados</p> <p>Incluída nas características clínicas, mas não exclusiva</p>
Linfoadenopatia	<p>Horning e Cohen (1995)</p> <p>Falkler e col. (1987)</p>	<p>Presente em 44% dos pacientes com GUN</p> <p>Presente em 61% dos pacientes examinados</p>
Febre e Mal-estar	<p>Wilson (1952)</p> <p>Falkler e col. (1987)</p>	<p>Pode existir uma elevação da temperatura até 39° ou 40°, com mal-estar geral</p> <p>Temperatura elevada presente em 39% dos pacientes com GUN</p>

Tabela 2. Estudos experimentais microbiológicos

Investigadores	Experiência	Resultados
MacDonald <i>e col.</i> (Loesche <i>e col.</i> , 1982; Johnson <i>e Engel</i> , 1986; Falkler <i>e col.</i> , 1987)	Combinação de 4 microrganismos para produção de infeção em porcos	Complexo Fusoespiroquetário não é essencial para produzir a infeção; <i>B. intermedius</i> é o patogénio essencial para a inoculação
Mergenhagen <i>e Hampp</i> (Johnson <i>e Engel</i> , 1986; Rowland, 1999)	Pequenas treponemas usadas em culturas puras separadamente e em combinação com outros isolados orais para produzir infeções em porcos	<i>B. vicentii</i> e a <i>B. buccalis</i> foram capazes de induzir infeções localizadas e abscessos na pele de porcos; As infeções ulcerativas, necróticas e pseudomembranosas são infeções mistas complexas envolvendo pelo menos quatro organismos
Mikx <i>e Van Campen</i> (Johnson <i>e Engel</i> , 1986; Falkler <i>e col.</i> , 1987)	Inoculação de cultura fusoespiroquetária de cães com lesões de GUN, em cães beagle pré-tratados com esteroides	Através de uma imunossupressão induzida pelos esteroides, é possível transmitir a GUN de animal para animal

Tabela 3. Proporções dos microrganismos da flora constante da placa bacteriana de pacientes com GUN, para os estudos de Loesche *e col.*, Falkler *e col.* e Gmur *e col.*

		Loesche <i>e col.</i> (1982)	Falkler <i>e col.</i> (1987)	Gmur <i>e col.</i> (2004)
Amostra Cultivável	<i>B. intermedius</i>	24%	0,1%	8,1%
	<i>Fusobacterium sp.</i>	3,1%	4,5%	3%
Amostra Microscópica	<i>Treponema sp.</i>	32%	30%	22%
	Selenomonas	6%	*	2,6%
	Bacilos e Cocos	69%	72%	65,1%

*As Selenomonas não são discriminadas no estudo de Falkler *e col.*

Tabela 4. Produtos do metabolismo da *F. nucleatum* e seus efeitos nos tecidos do hospedeiro.

Referências	Metabolitos	Ações no hospedeiro
Singer <i>e</i> Buckner, 1981; Bartold <i>e col.</i> , 1991; Bolstad <i>e col.</i> , 1996	Butirato* Propionato Amónia*	Inibição da proliferação dos fibroblastos gengivais; Capacidade de penetrar o epitélio gengival; Presentes em níveis elevados na placa bacteriana associada à periodontite

*Produtos metabólicos com inibição mais potente da proliferação dos fibroblastos (Bartold *e col.*, 1991).